



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

“Remoción de plomo (Pb) por plantas normales y transgénicas de *Scirpus americanus* (tule) y estudio de los mecanismos bioquímicos involucrados en la tolerancia”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS

PRESENTA

Elizabeth Esquivel Ramos

Directora de tesis

Dra. María del Socorro C. Santos Díaz

Co-Directora

Dra. María Catalina Alfaro de la Torre



San Luis Potosí, S. L. P., a 25 de Agosto de 2020

El programa de Maestría en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 000519, en el nivel consolidado.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT:

2018-000012-01NACF-0150



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“Remoción de plomo (Pb) por plantas normales y transgénicas
de *Scirpus americanus* (tule) y estudio de los mecanismos
bioquímicos involucrados en la tolerancia”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS**

PRESENTA

Q. F. B. Elizabeth Esquivel Ramos

Sinodales:

Dra. María del Socorro C. Santos Díaz _____

Dra. María Catalina Alfaro de la Torre _____

Dr. Gustavo Cruz Rodríguez _____

San Luis Potosí, S. L. P., a 25 de Agosto de 2020





`
Remoción de plomo (Pb) por plantas normales y transgénicas de Scirpus americanus (tule) y estudio de los mecanismos bioquímicos involucrados en la tolerancia by Elizabeth Esquivel Ramos is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License.`

INTEGRANTES DEL SUBCOMITÉ DE TESIS

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María del Socorro C. Santos Díaz
Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

CO-DIRECTORA

Dra. María Catalina Alfaro de la Torre
Laboratorio de Elementos Traza
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

COMITÉ TUTORIAL EXTENDIDO

Dr. Gustavo Cruz Jiménez
Laboratorio de Evaluación Toxicológica y Riesgo Ambientales
División de Ciencias Naturales y Exactas
Departamento de Farmacia
Universidad de Guanajuato

Son cosas chiquitas.

No acaban con la pobreza,
no nos sacan del subdesarrollo,
no socializan los medios de producción y de cambio,
no expropian las cuevas de Alí Babá.

Pero quizá desencadenen la alegría de hacer,
y la traduzcan en actos.

Y al fin y al cabo,
actuar sobre la realidad y cambiarla,
aunque sea un poquito,
es la única manera
de probar que la realidad
es transformable.

Eduardo Galeano

Fragmento de: El derecho a la alegría, en *ser como ellos y otros artículos* (1990)

Agradecimientos

Agradezco primeramente a la sociedad mexicana que a través de sus contribuciones en impuestos hizo posible se me otorgara la beca de manutención por parte de CONACYT.

A la Dra. Ma. Del Socorro C. Santos Díaz por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo desarrollando este trabajo de investigación en su laboratorio y por su asesoría y dirección a lo largo de todo este tiempo.

A la Dra. Ma. Catalina Alfaro por su asesoría, recomendaciones y porque al ser becaria en su laboratorio encontré el interés en participar en un proyecto de investigación cuando aún era estudiante de licenciatura.

Al Dr. Gustavo Cruz por sus observaciones y recomendaciones sobre esta tesis.

A la M. C. Ma. de Lourdes Santos Díaz por sus recomendaciones sobre el cultivo vegetal y a la I. A. María Estela Núñez Pastrana por su apoyo en la cuantificación del plomo en el espectrofotómetro de flama.

Al Dr. Ramón Fernando García de la Cruz por el apoyo con equipo de laboratorio y porque durante la licenciatura fue una de las principales personas que me motivó a integrarme a un posgrado al comentarme sobre las opciones y oportunidades que había en la FCQ.

A mis compañeros de generación Julieta, Jovana, Carlos y Emmanuel por compartir las preocupaciones y el apoyo en las materias.

A todos mis compañeros de laboratorio, Toño, Karen, Miguel, Sarahí, Carlos, Dany, Cary por el tiempo compartido, las pláticas, las risas, la energía que me transmitieron y por convertirse en amigos.

A los vecinos del laboratorio y a la Dra. Ruth Soria Guerra por el apoyo cuando necesité reactivos y por ser la compañía de los fines de semana.

Al jiu-jitsu, mi profesor y compañeros por ayudarme a mantener la calma en los tiempos difíciles.

A mi familia y amigas, con quienes siempre puedo contar a pesar de mis ausencias y a quienes agradezco todo el apoyo para llegar al final de esta etapa.

¡Gracias a todos!

Dedicatoria

A mi tío Arnulfo

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
Índice de cuadros.....	v
Índice de figuras.....	vi
RESUMEN	I
SUMMARY	II
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Metales pesados y su toxicidad	1
1.2 Fitorremediación.....	5
1.3 Mecanismos de tolerancia a metales pesados	9
1.4 Uso de técnicas de ingeniería genética para incrementar tolerancia a metales.	18
1.5 Uso de cultivos <i>in vitro</i> para la remoción de contaminantes.	19
II. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN E HIPOTESIS	27
2.1 Antecedentes	27
2.2 Justificación.....	29
2.3 Hipótesis	31
III. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo general.....	32
3.2 Objetivos específicos	32
IV. MATERIALES Y METODOS.....	33
4.1 Preparación de soluciones para ajustar pH	33
4.1.1 Solución de HCl 0.1 N.....	33
4.1.2 Solución de KOH 1.0 N	33
4.1.3 Solución de NaOH 0.1 N.....	33
4.2 Soluciones para lavado de material	33
4.2.1 Solución de HNO ₃ al 10%.....	33
4.2.2 Solución para lavado de tules	33
4.3 Soluciones para la prueba histoquímica de detección del gen GUS	33
4.3.1 Buffer de fosfatos (sódico) 1.0 M pH 7.0	33
4.3.2 Buffer de fosfatos 0.1 M	34
4.3.3 EDTA 0.25 M.....	34

4.3.4 Ferrocianuro de potasio [K ₃ Fe(CN) ₆] 5mM.....	34
4.3.5 Ferricianuro de potasio [K ₄ Fe(CN) ₆] 5mM.....	34
4.3.6 Tritón al 10 %.....	34
4.3.7 X-Gluc 40 mM.....	34
4.4 Solución para desorción de Pb.....	35
4.4.1 Solución de HNO ₃ 0.042%	35
4.5 Soluciones para cuantificación de Pb.....	35
4.5.1 Solución de HNO ₃ al 0.5% (v:v).....	35
4.5.2 Curva de calibración estándar de Pb	35
4.6 Reactivos para extracción de proteínas y su cuantificación	36
4.6.2 Buffer de extracción de proteínas (BEP)	37
4.6.3 Reactivo de Bradford	37
4.6.4 Albúmina de suero bovino fetal (BSA) 1 mg/mL	37
4.7 Reactivos para la determinación de la actividad de la SOD	37
4.7.1 Buffer de carbonatos 0.1 M a pH 10.2.....	37
4.7.2 L-metionina 0.1 M	38
4.7.3 Azul de nitrotetrazolium (NBT) 0.01 M.....	38
4.7.4 Riboflavina 0.01 mM.....	38
4.8 Reactivos para la determinación de actividad de CAT.....	39
4.8.1 Buffer de fosfato de sodio y potasio 0.1 M, pH 6.5.....	39
4.8.2 H ₂ O ₂ 120 mM.....	39
4.9 Reactivos para la determinación de actividad de POX	39
4.9.1 Buffer citrato-fosfato 50 mM a pH 5.0	39
4.9.2 H ₂ O ₂ 5 mM.....	39
4.9.3 ABTS 5 mM	40
4.10 Reactivos para la cuantificación de GSH total (kit de detección colorimétrica (Invitrogen No. EIAGSHC)	40
4.10.1 Reactivo de color	40
4.10.2 Acido 5-sulfosalicílico (ASS) al 5% (P/V).....	40
4.10.3 Solución de dilución (ASS) al 1% (v/v).....	40
4.10.4 Preparación de curva de calibración estándar	41
4.10.5 Preparación de mezcla de reacción	41

4.11 Soluciones para preparación de medios.....	41
4.11.1 Soluciones para medio Murashige y Skoog (MS)	41
4.11.2 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV).....	42
4.11.3 Soluciones para medio hidropónico modificado.....	42
4.12 Preparación de medios de cultivo	43
4.12.1 Medio MS sólido.....	43
4.12.2 Medio MS líquido	43
4.13 Medio hidropónico.....	43
4.13.2 Medio modificado	44
4.13.3 Medio con diferentes concentraciones de exposición a Pb.....	44
4.14 Lavado de material	44
4.15 Material vegetal	45
4.15.1 Cultivo de raíces	45
4.16 Resiembra de plantas normales y transgénicas <i>in vitro</i>	45
4.17 Establecimiento de los cultivos de tule <i>ex vitro</i>	45
4.18 Prueba histoquímica de la β -glucuronidasa (GUS).....	46
4.19 Modelación de las especies químicas presentes en el medio	46
4.20 Determinación de la dosis de Pb en cultivos hidropónicos de tule	46
4.21 Cuantificación de peso fresco y seco.....	47
4.22 Concentración de clorofila, pH y temperatura	47
4.23 Cuantificación de plomo Pb en el medio y en tejido vegetal.....	48
4.24 Cinética de remoción de Pb	49
4.25 Obtención de los extractos enzimáticos.....	49
4.26 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	49
4.27 Cuantificación de la actividad antioxidante	50
4.27.1. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	50
4.27.2 Actividad de la catalasa (CAT)	51
4.27.3 Actividad de la peroxidasa (POX).....	51
4.27.4 Cuantificación de glutatión (GSH) total	52
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
5.2 Especiación del Pb en diferentes medios	¡Error! Marcador no definido.

5.3 Efecto de diferentes concentraciones de plomo en el desarrollo de plantas normales y transformadas de tule	¡Error! Marcador no definido.
5.4 Remoción de Pb del medio por plantas de tule	¡Error! Marcador no definido.
5.5 Actividad antioxidante en plantas de tule	¡Error! Marcador no definido.
5.5.1 Actividad de la peroxidasa	¡Error! Marcador no definido.
5.5.2 Actividad de la superóxido dismutasa	¡Error! Marcador no definido.
5.5.3 Actividad de la catalasa.....	¡Error! Marcador no definido.
5.5.4 Concentración de glutatión total.....	¡Error! Marcador no definido.
VI. CONCLUSIONES	79
VII. PERSPECTIVAS	80
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	81
IX. ANEXOS.....	94
9.1 Tratamiento de residuos con Pb	94
X. GLOSARIO	95

Índice de cuadros

Cuadro 1. Métodos fisicoquímicos para la remediación de metales pesados	6
Cuadro 2. Plantas modificadas genéticamente para incrementar su tolerancia a metales.....	21
Cuadro 3. Remoción de metales por cultivos <i>in vitro</i> de “raíces peludas”	26
Cuadro 4. Reacción para la detección histoquímica del gen reportero GUS	35
Cuadro 5. Preparación de soluciones estándar para la curva de calibración de Pb en el espectrofotómetro de flama	36
Cuadro 6. Preparación de buffer de extracción de proteínas (BEP)	37
Cuadro 7. Buffer de reacción para la determinación de la actividad de la SOD.....	38
Cuadro 8. Reacción para la determinación de la actividad de la CAT.....	39
Cuadro 9. Buffer de reacción para la determinación de la actividad de la POX.....	40
Cuadro 10. Reacción para la determinación concentración de GSH total	41
Cuadro 11. Porcentaje de precipitación de Pb en medio Hoagland, Steiner y MS.....	54
Cuadro 12. Composición de medios modificados	55
Cuadro 13. Porcentaje de precipitación de Pb a diferentes concentraciones en medios modificados	56
Cuadro 14. Efecto de diferentes concentraciones de plomo en la clorosis de plantas normales y línea T12 ¹	60
Cuadro 15. Factor de bioacumulación (FBC) y translocación (FT) de plantas de tule normales (N) y transformadas (T12) expuestas a 40 y 400 ppm de Pb al día 8.	71

Índice de figuras

Figura 1. Daño oxidativo inducido por metales pesados en células vegetales.	2
Figura 2. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células vegetales.	3
Figura 3. Mecanismos involucrados en la fitorremediación de metales pesados/metaloides.	7
Figura 4. Estructura del A) glutatión (GSH) Y B) glutatión disulfuro (GSSG).....	11
Figura 5. A) Estructura de las fitoquelatinas (FQs), B) Síntesis de FQs por la enzima fitoquelatina sintasa (FQS o PCS1) y C) Posible estructura Fitoquelatina (FQ) – Pb	12
Figura 6. Estructura de una metalotioneína (MT).....	13
Figura 7. Generación de ERO por metales pesados (Pb^{2+}) y su eliminación por las enzimas antioxidantes CAT, SOD y POX así como la generación del GSH por acción de la GPX.	14
Figura 8. Transportadores identificados en la movilización e incremento de la tolerancia a Pb	16
Figura 9. Técnicas para el aprovechamiento de la biomasa residual generada en procesos de fitorremediación	18
Figura 10. Estructura de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV). A) auxina y B) citocinina..	24
Figura 11. Morfología de <i>Scirpus americanus</i>	27
Figura 12. A) Raíces de tule transformadas con fenotipo piloso, B) planta regenerada de tule (línea T12)	29
Figura 13. Cultivos de tule en condiciones de vivero.....	53
Figura 14. Distribución de especies de Pb en función de pH (MINTEQ2A)	56
Figura 15. Efecto del Pb en la longitud de los tallos de tule. A) plantas normales (N) y B) plantas transformadas (T12).....	58

Figura 16. Efecto del Pb en la longitud de la raíz de tule. A) plantas normales (N) y B) plantas transformadas (T12).....	59
Figura 17. Concentración de clorofila total en A) plantas normales (N) y B) plantas transformadas (T12) expuestas a Pb.....	61
Figura 18. Variación del pH en el medio con plantas de tule expuestas a 400 ppm de Pb.....	63
Figura 19. Concentración de Pb en el medio hidropónico a 400 ppm de Pb en presencia de plantas normales (N) y plantas transformadas (T12).....	64
Figura 20. Concentración de Pb en A) raíces y tallo de plantas de tule normales (N) y transformadas (T12) expuestas a 400 ppm de Pb y B) Pb adherido a las raíces.....	65
Figura 21. Variación del pH en el medio con plantas de tule expuestas a 40 ppm de Pb.....	66
Figura 22. Concentración de Pb en el medio hidropónico a 40 ppm de Pb en presencia de plantas normales (N) y plantas transformadas (T12).....	67
Figura 23. Concentración de Pb en A) raíces y tallo de plantas de tule normales (N) y transformadas (T12) expuestas a 40 ppm de Pb y B) Pb adherido a las raíces.....	68
Figura 24. Actividad específica (A. E.) de la peroxidasa (POX) en plantas de tule A) normales (N) y B) transformadas (T12) expuestas a 400 ppm de Pb.	75
Figura 25. Actividad específica (A. E.) de la superóxido dismutasa (SOD) en plantas de tule A) normales (N) y B) transformadas (T12) expuestas 400 ppm de Pb.....	76
Figura 26. Actividad específica (A. E.) de la catalasa (CAT) en plantas de tule A) normales (N) y B) transformadas (T12) expuestas 400 ppm de Pb.	77
Figura 27. Concentración de Glutati6n (GSH) total a lo largo del tiempo en plantas de tule A) normales (N) y B) transformadas (T12) expuestas a 400 ppm de Pb.....	78

RESUMEN

La exposición al plomo (Pb) provoca severos daños a la salud por lo que es necesario contar con métodos eficientes para su remoción, como la fitorremediación. En este trabajo, se analizó la máxima capacidad de plantas normales de *Scirpus americanus* (tule) y plantas transformadas (línea T12) para remover Pb. También se cuantificó la actividad de las enzimas antioxidantes peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, y el contenido de glutatión. Las plantas N y T12 sobrevivieron a 400 ppm de Pb y acumularon el metal principalmente en la raíz (53,430 ppm, plantas N; 39,740 ppm, T12). La tolerancia al Pb incluyó una mayor síntesis de glutatión y no hubo cambios importantes en los niveles de las enzimas antioxidantes estudiadas.

SUMMARY

Lead (Pb) exposure causes severe damage to health, therefore, it is necessary to develop efficient methods for its elimination, such as the phytoremediation. In this work, the maximum capacity of *Scirpus americanus* (tule) normal plants (N) and transformed plants (line T12) to remove Pb was analyzed. Also, the activity of the antioxidant enzymes peroxidase, superoxide dismutase and catalase plus glutathione content was quantified. The N and T12 plants survived at 400 ppm Pb, and mainly accumulated the metal on roots (53,430 ppm, N plants; 39,740 ppm, T12 plants). Pb tolerance included a high glutathione synthesis but no important changes on antioxidant enzymes levels.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Metales pesados y su toxicidad

El término “metal pesado” generalmente se utiliza para nombrar a los elementos con peso atómico entre 63.5 y 200.6 g/mol y con gravedad específica mayor a 5 g/cm³. Algunos metales, en cantidades traza, son esenciales para el crecimiento y desarrollo de los organismos vivos como cobre (Cu), cobalto (Co), hierro (Fe), manganeso (Mn), níquel (Ni) y zinc (Zn). Otros como cadmio (Cd) y plomo (Pb) no tienen actividad fisiológica (Srivastava & Majumder, 2008) pero son movilizados a través de la extracción minera y utilizados en gran cantidad de procesos industriales. Estos metales pueden seguir cuatro rutas: permanecer en el suelo disueltos o fijados, ser absorbidos por las plantas e incorporarse a la cadena trófica, pasar a la atmósfera por volatilización o moverse a las aguas superficiales o subterráneas (Simón et al., 2001).

La toxicidad de los metales pesados se debe a su capacidad para unirse a ligandos específicos en las moléculas orgánicas, como grupos sulfhidrilo (SH⁻), amino (NH₂), fosfato (PO₄⁻), carboxilo (COO⁻) e hidroxilo (OH⁻). Esta unión ocasiona la activación o inhibición de enzimas y otras proteínas involucradas en el metabolismo y desarrollo; también provocan deficiencias o desnutrición, y la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y otros radicales libres que pueden llegar a provocar estrés oxidativo (Barceló & Poschenrieder, 1992).

En las plantas estas alteraciones provocan deficiencias en la biosíntesis de clorofila, transporte electrónico y enzimas del proceso fotosintético (Hodges & Forney, 2001). Estudios *in vitro* han demostrado que los metales inducen daño oxidativo celular e interfieren en el crecimiento y el metabolismo (Buscaroli, 2017). El daño oxidativo en las plantas incluye la peroxidación lipídica de membranas, causando rupturas y subproductos de las cadenas hidrocarbonadas; daños en el ADN, mutaciones, aberraciones cromosómicas, alteraciones en la síntesis y reparación de los ácidos nucleicos y transformaciones celulares (Figura 1) (Barceló & Poschenrieder, 1992).

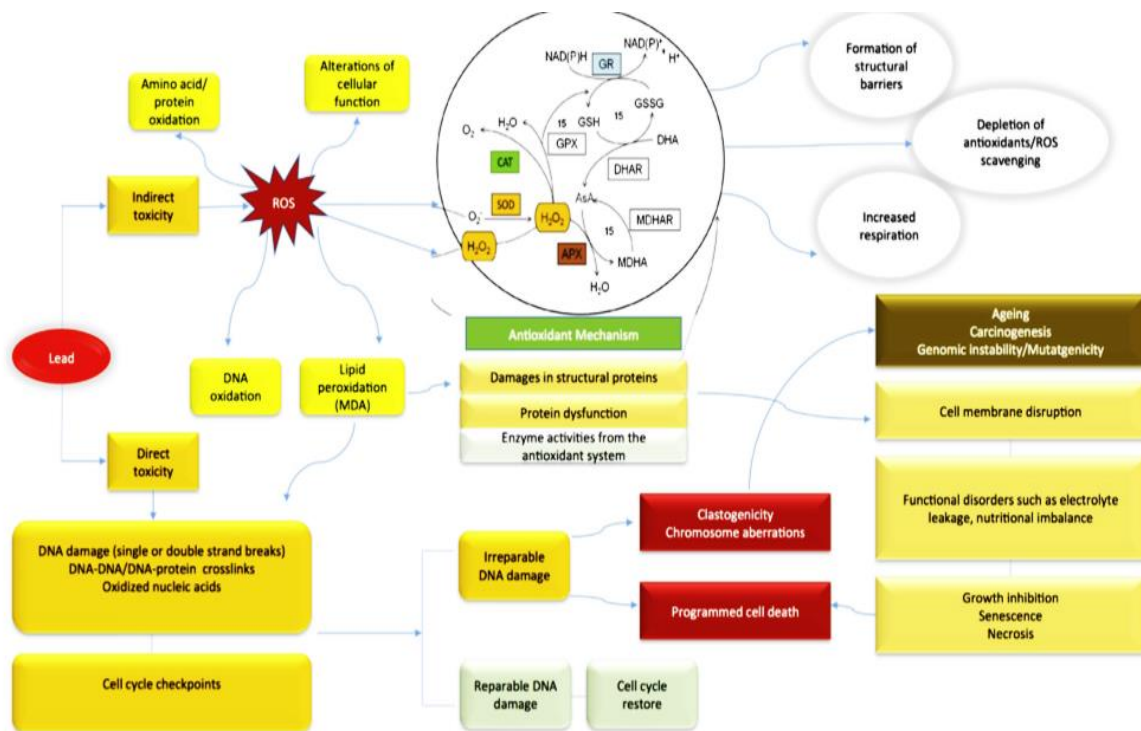


Figura 1. Daño oxidativo inducido por metales pesados en células vegetales (Tomado de Hossain, Piyatida, da Silva & Fujita, 2012)

El comportamiento oxidativo de los metales pesados se debe en gran medida a que participan en dos reacciones químicas productoras de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y del anión superóxido $O_2^{\cdot -}$ (Figura 2). La primera, conocida como reacción de Fenton, corresponde a la descomposición del H_2O_2 mediante la adición de sales de Fe, para formar un radical hidroxilo (OH^{\cdot}):

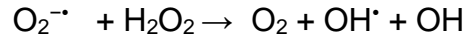


El OH^{\cdot} es altamente reactivo y puede producir procesos de oxidación en cascada. En general lo que ocurre en la célula es una gran descompensación electrónica, debida a los radicales formados por el radical OH^{\cdot} que pueden generar otros radicales y reducir u oxidar especies químicas presentes en el medio. Otros iones metálicos como el Cu^+ y Cu^{2+} pueden reemplazar a los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} en estas reacciones (Arora, Sairam & Srivastava, 2002).

La segunda reacción es la de Haber – Weiss que incluye dos etapas. En la primera se utiliza el radical OH^\bullet producido por la reacción de Fenton para reaccionar con más H_2O_2 y originar $\text{O}_2^{\bullet-}$:



En la segunda, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ producido reacciona con más H_2O_2 , para volver a dar los productos no metálicos de la reacción de Fenton.



Estas ERO a bajas concentraciones tienen un papel en la señalización celular en respuesta a diversos tipos de estrés. Los sitios principales de producción de ERO son los cloroplastos, peroxisomas y mitocondria (Navarro-Aviñó, Alonso, & López-Moya, 2007).

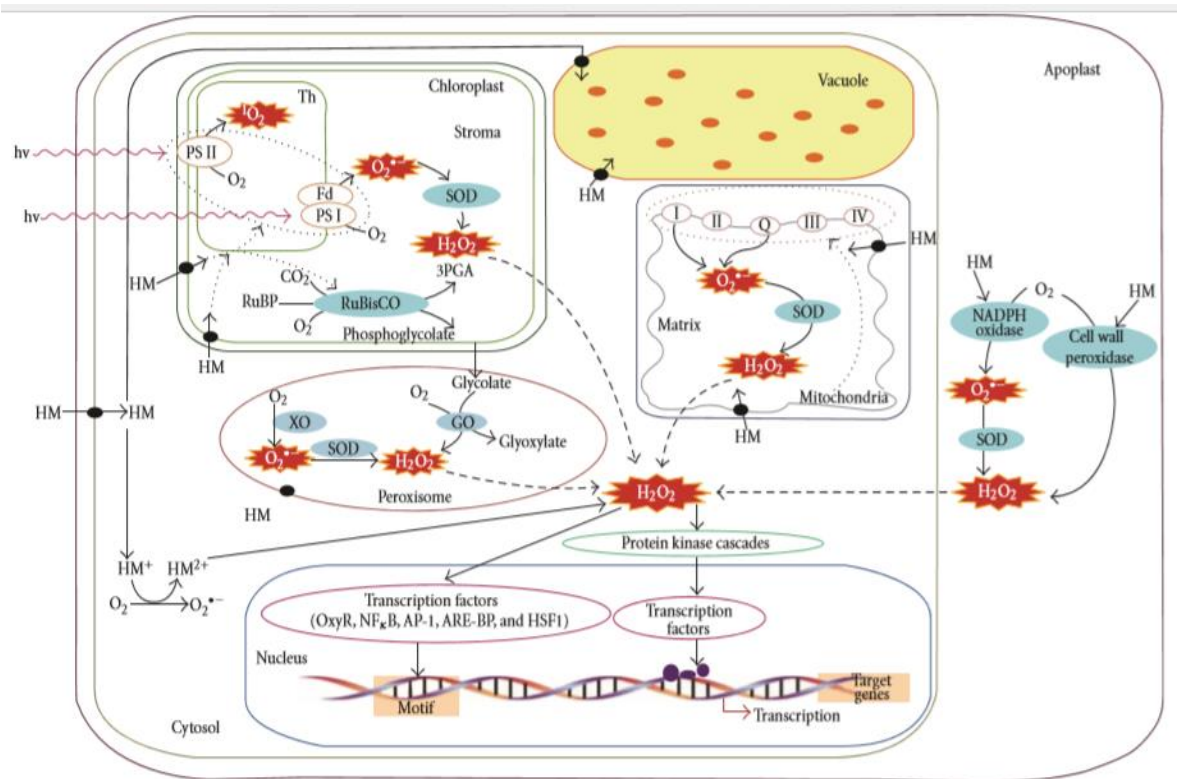


Figura 2. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en diferentes organelos de las células vegetales (Tomado de Hossain et al., 2012)

Uno de los metales pesados más tóxicos es el Pb. Este metal tiene una densidad relativa 11.4 g/cm^3 a $16 \text{ }^\circ\text{C}$, de color grisáceo, con aspecto brillante cuando se corta, pero al ser expuesto al aire se oxida rápidamente cambiando de color a un tono mate. El Pb se obtiene de la galena (sulfuro de plomo, PbS), la forma más abundante de este elemento en la naturaleza, asociada generalmente a diversos minerales de Zn, Cu, Cd y Fe, entre otros. El Pb es muy dúctil, maleable, resistente a la corrosión y pobre conductor de la electricidad por lo que es ampliamente usado (Manual Para El Manejo Ambientalmente Responsable De Plomo, Cámara Minera de México, 2015).

Las fuentes antropogénicas de Pb incluyen las actividades mineras, la producción de materiales industriales y, en algunos países, el uso persistente de pinturas y gasolinas con plomo. Más de tres cuartas partes del consumo mundial de plomo corresponden a la fabricación de baterías de plomo-ácido para vehículos de motor. El Pb también se emplea en la fabricación de material de soldadura, vidrieras, vajillas de cristal, municiones, esmaltes cerámicos, artículos de joyería, juguetes, productos cosméticos, medicamentos tradicionales y en dispositivos para evitar irradiación con Rayos X. El agua potable canalizada a través de tuberías de plomo o con soldadura a base de este metal es otra fuente de ingestión de plomo (Charlesworth, De Miguel & Ordóñez, 2011; OMS 2019).

El uso generalizado de productos con plomo ha generado una importante contaminación del medio ambiente, ocasionando graves problemas a la salud.

En los niños el daño es mayor, por su menor masa y la absorción gastrointestinal es hasta cinco veces más que en adultos; por ello, la distribución y acumulación en órganos es mayor, afectando el desarrollo cerebral y ocasionando una reducción del cociente intelectual y cambios en el comportamiento (Flores et al., 2012). Los niños con desnutrición son aún más vulnerables ya que el Pb sustituye, al calcio en los huesos. En mujeres embarazadas incrementa el riesgo de aborto espontáneo, parto prematuro y malformaciones en el feto (OMS, 2019). En adultos, si el grado de exposición es elevado, afecta el cerebro y sistema nervioso central, pudiendo provocar coma, convulsiones e incluso la muerte. La exposición al Pb también provoca anemia, hipertensión, disfunción renal, inmunotoxicidad y toxicidad reproductiva. Se cree que

los efectos neurológicos y conductuales asociados al Pb son irreversibles y se estima que no existe un nivel de concentración de Pb en sangre que pueda considerarse exento de riesgo ya que existe una correlación entre el incremento de la concentración y los efectos que se presentan (OMS, 2019).

Existen diversos esfuerzos a nivel mundial para controlar la exposición al plomo, entre ellas las campañas realizada por la OMS “Eliminación de gasolina con plomo a nivel mundial” iniciada en 2002 y “Pinturas libres de plomo” iniciada en 2017. La primera ha logrado eliminar el Pb de las gasolinas, excepto en Algeria, Yemen e Irak. La segunda tiene como objetivo lograr que para el 2020 los países miembros de la ONU establezcan una regulación del contenido de Pb en las pinturas que se venden; a la fecha el 37% de los países ha introducido normativas en la regulación a este respecto, no obstante, existen numerosos sitios contaminados con Pb, que incluyen tanto suelos como agua (OMS, 2019).

Ya que el Pb no se degrada deben usarse métodos para su remoción (Cuadro 1). Los métodos comunes emplean agentes fisicoquímicos que en la mayoría de las ocasiones afectan la fertilidad del suelo y tienen profundos efectos negativos en el ecosistema, además de que tienen un costo muy elevado (Movahed & Mohammad, 2009). Los métodos actuales incluyen principalmente la precipitación del elemento a través de compuestos con fosfato (Aide & Braden, 2018); sin embargo, esto no garantiza la remoción del contaminante del medio. Una alternativa biotecnológica a esta problemática es la fitorremediación (Kushwaha et al., 2018).

1.2 Fitorremediación

La “fitorremediación” es el uso de las plantas para la remoción de contaminantes del medio ambiente. Según Jabeen, Ahmad & Iqbal, M. (2009), dependiendo del tipo de contaminante, las condiciones del sitio y el nivel de limpieza requerido, las tecnologías de fitorremediación se pueden utilizar como medio de contención o de eliminación (Figura 3). La rizofiltración utiliza las plantas para eliminar del medio contaminantes a través de su captación y secuestro en la raíz (Dushenkov et al, 1995).

Cuadro 1. Métodos fisicoquímicos para la remediación de metales pesados

MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Precipitación	Bajo costo, operación sencilla	Generación de lodos, costo extra
Coagulación - Floculación	Tiempo corto	Generación de lodos, costo extra
Flotación	Bajo costo, menor tiempo de retención	Debe utilizarse varias veces
Intercambio iónico	No genera lodos, menor tiempo de ejecución	Alto costo por las resinas que se utilizan
Ultrafiltración	Requiere espacios pequeños	Alto costo operacional, membrana susceptible
Nanofiltración	Baja presión (7 a 30 bar)	Costo, membrana susceptible
Ósmosis inversa	Alta eficiencia, puede llevarse a cabo a temperatura elevada	Alto consumo de energía (20 a 100 bar)

La fitoestabilización permite inmovilizar contaminantes en el suelo a través de su adsorción y acumulación en las raíces por precipitación en la zona de la rizosfera. Este proceso reduce la movilidad de los contaminantes y evita su migración a las aguas subterráneas o al aire (Delgadillo-López et al., 2011).

En la fitoestimulación las raíces de las plantas exudan azúcares simples, aminoácidos, compuestos alifáticos y aromáticos, nutrientes, enzimas y oxígeno para favorecer el crecimiento de microorganismos cuyo metabolismo sea capaz de mineralizar o degradar los contaminantes (Delgadillo-López et al., 2011).



Figura 3. Mecanismos involucrados en la fitorremediación de metales pesados/metaloideos (adaptado de Sarwar, et al., 2017, León & Esteban, 2012).

En la fitodegradación las plantas y los microorganismos asociados a ellas degradan los contaminantes orgánicos en productos inofensivos, o bien, son mineralizarlos hasta CO₂ y H₂O.

La fitoextracción o fitoacumulación consiste en la absorción de metales por las raíces de las plantas y su acumulación en raíz, tallos y hojas. Los metales son removidos y translocados desde la raíz a tejidos aéreos, de manera similar a los nutrientes. Las vías de transporte son tres: apoplástica (vía paredes celulares), simplástica (vía citoplasma/plasmodesmos) y/o transmembranal (vía transportadores de membrana). En el caso de los metales/metaloides éstos pueden ser secuestrados en la pared celular, vacuolas y aparato de Golgi (Gerhardt et al, 2017).

La fitovolatilización se produce a medida que las plantas en crecimiento absorben agua junto con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Algunos de estos pueden llegar hasta las hojas y sublimarse o volatilizarse en la atmósfera (León & Esteban, 2012). Mediante este proceso se eliminan compuestos orgánicos volátiles (benceno, nitrobenceno, tolueno, etilbenceno y xileno) y metales como As, Se y Hg (Burke, Weis & Weis, 2000).

Para la remoción de contaminantes por las plantas se deben considerar dos factores importantes: que posean gran biomasa y su eficiencia de bioconcentración. A pesar de que existen plantas hiperacumuladoras que son buenas candidatas para la fitorremediación, muchas de ellas poseen poca biomasa. En el caso del Pb, se han identificado especies hiperacumuladoras, en suelo, como *Noccaea (Thlaspi) cepaeifolium* sp. en los Alpes del sudeste (Bothe & Słomka, 2017) y *Sedum alfredii* H. en un área minera al sudeste de China (Gupta et al., 2010).

Las concentraciones para que una planta se considere acumuladora dependen del metal, ya que no todos presentan la misma toxicidad, se consideran hiperacumuladoras cuando acumulan entre 10,000 µg/g de peso seco de Zn o Mn, 1000 µg/g Cu, Pb, Ni, As y 100 µg/g de Cd (Wu et al., 2018).

Zayed, Gowthaman & Terry, en 1998, establecieron un sistema de clasificación de las plantas con capacidad de acumulación utilizando para ello el cálculo del Factor de

Bioconcentración, el cual relaciona el contenido de metal en el tejido con el metal presente en el suelo y se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$FBC = \frac{\text{Concentración de Pb en el tejido } (\mu\text{g/g})}{\text{Concentración inicial de Pb en el medio } (\mu\text{g/mL})}$$

Un $FBC < 300$ corresponde a una planta acumuladora leve, entre 300 y 800 a acumuladoras moderadas y > 800 indica que la planta es hiperacumuladora.

El Factor de Translocación (FT), relaciona la cantidad de metal en la raíz y el metal acumulado en los tejidos aéreos y se calcula según la fórmula:

$$FT = \frac{\text{Concentración de Pb en el tallo } (\mu\text{g/g})}{\text{Concentración de Pb en la raíz } (\mu\text{g/g})}$$

Un $FT > 1$ indica que una planta tiene buena capacidad de translocación.

1.3 Mecanismos de tolerancia a metales pesados

Los mecanismos de tolerancia varían entre las distintas especies de plantas y están determinados por el tipo de metal, eficiencia de absorción, translocación y secuestro. Incluyen la activación de sus sistemas enzimáticos y no enzimáticos, la síntesis de fitoquelatinas (FQs) y metalotioneinas (MTs), la acumulación de compuestos fenólicos, la inducción de transportadores en la membrana y en tonoplasto, entre otros (Talebi et al., 2019).

Los sistemas antioxidantes incluyen la síntesis de ascorbato (AsA), glutatión (GSH), tocoferol (Vitamina E), pigmentos carotenoides y compuestos fenólicos (Gill & Tuteja, 2010).

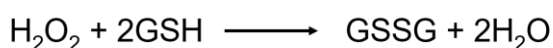
El AsA es un derivado de la glucosa, tiene estructura de lactona y sus grupos hidroxilos asociados al doble enlace tienen alto potencial reductor, por lo cual puede reducir directamente al oxígeno, funcionando así, como donante en las reacciones de las peroxidasas (Pedrazani et al., 2003)

El AsA un regulador del estado redox de las células, se puede encontrar en todos los compartimentos celulares y en las plantas es el más importante, probablemente también, el único en el apoplasto (Pignocchi & Foyer, 2003).

El AsA es oxidado por el oxígeno, O₂, O₂^{-•}, ¹O₂ y H₂O₂ para dar lugar al radical monodeshidroascorbato (MDHA), el cual se descompone en AsA o dehidroascorbato (DHA) (Smirnoff, 2000). Se tiene evidencia de que el AsA a través de sus formas oxidadas participa en la regulación de la división y el desarrollo celular (Pignocchi & Foyer, 2003).

El glutatión (GSH) actúa como un reductor para proteger los grupos tioles (R-SH) de enzimas, participa en la regeneración del AsA a partir de la reacción con ¹O₂ y OH[•], (Arora et al., 2002; Pignocchi & Foyer, 2003), en la división celular, la floración y la detoxificación de xenobióticos y metales pesados (Yadav, 2010).

En esta reacción el GSH es oxidado a glutatión bisulfato (GSSG). La reacción puede escribirse como:



El GSH se sintetiza en dos pasos dependientes de ATP, en la primera reacción la γ -glutamylcisteína sintetasa (GCS o GSH1) sintetiza glutamylcisteína (Glu-Cys) a partir del L-glutamato (Glu) y la cisteína (Cys). Esta reacción es el paso limitante en la síntesis de GSH. Posteriormente, se añade la glicina (Gly) a la fracción C terminal de la γ -Glu-Cys por la enzima glutatión sintetasa (GS o GSH2) obteniéndose el GSH (Foyer y Noctor, 2011). La reacción de síntesis del GSH es la siguiente:



En *Arabidopsis thaliana* y *Brassica juncea* se encontró que la GSH1, se localiza principalmente en plástidos, mientras que la GSH2 se encuentra también en el citosol (Heiss, Wachter, Bogs, Cobbett & Rausch, 2003).

En esta reacción el glutatión (GSH) es oxidado en el grupo R-SH de la Cys a glutatión disulfuro (GSSG). En la Figura 4 se presentan las estructuras químicas de estas dos especies.

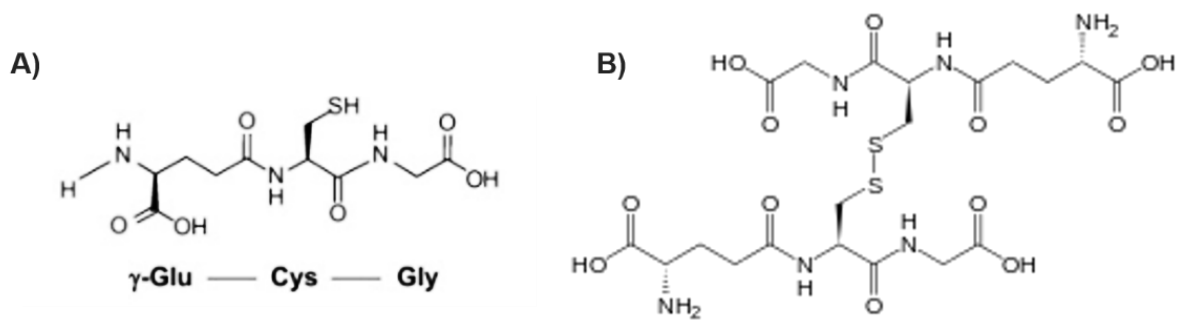


Figura 4. Estructura del **A)** glutati3n (GSH) Y **B)** glutati3n disulfuro (GSSG)

La formaci3n de GSSG es una reacci3n selenio dependiente donde participan las enzimas glutati3n peroxidasa (GPX) y glutati3n S-transferasa (GST). El GSH es regenerado por la enzima glutati3n reductasa (GR) utilizando NADPH como cofactor. Esta reacci3n se utiliza como indicadora del estado oxidativo de la c3lula y de la toxicidad celular (Foyer y Noctor, 2011).

El GSH es el precursor de las fitoquelatinas (FQs), las cuales se sintetizan por la enzima fitoquelatina sintetasa (FQS) una vez que el metal ha alcanzado concentraciones que comienzan a ser t3xicas (Figura 5), aunque el gen que codifica para la FQS se expresa de manera constitutiva. Las FQs tienen la capacidad de unirse a los metales y secuestrarlos en la vacuola (Cobbet, 2000).

Las PCs se aislaron por primera vez de cultivos celulares de plantas superiores expuestos a Cd (Grill, Winnacker & Zenk, 1985). Desde entonces se ha reportado la inducci3n de FQs por exposici3n a Cd, Hg, Cu, Zn, Pb y Ni (Yadav, 2010). Se ha documentado la s3ntesis de FQs como respuesta a la exposici3n al Pb y la formaci3n de complejos FQs-Pb (Piechalak, Tomaszewska, Baralkiewicz & Malecka, 2002) y se ha confirmado que su s3ntesis se presenta a concentraciones superiores a 700 μM de Pb (Zhang et al., 2008). Tambi3n se ha descrito la presencia de transportadores de las FQs a trav3s del xilema y floema en *Brassica napus* que funcionan como acarreadores de larga distancia (Mendoza et al., 2008).

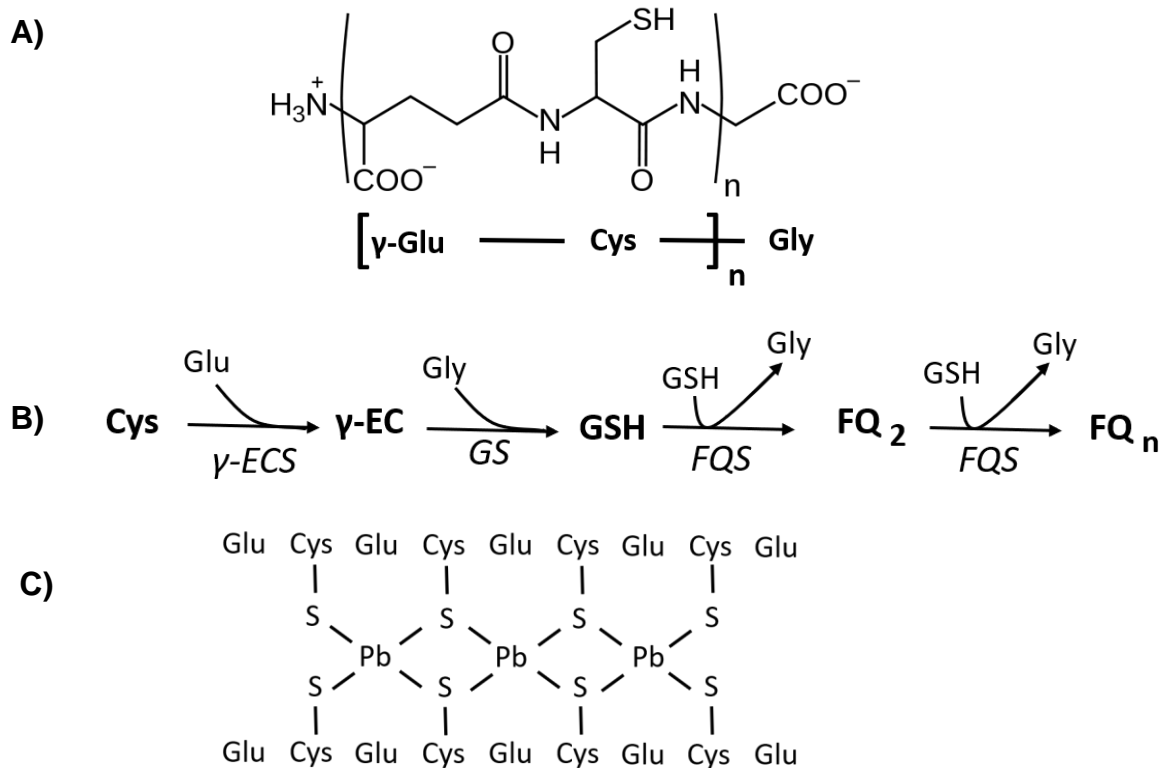


Figura 5. A) Estructura de las fitoquelatinas (FQs), **B)** Síntesis de FQs por la enzima fitoquelatina sintasa (FQS o PCS1) y **C)** Posible estructura Fitoquelatina (FQ) – Pb

Otras moléculas de bajo peso molecular con capacidad para quelar a los metales pesados son las metalotioneínas (MTs), moléculas de bajo peso molecular ricas en Cys (alrededor de 30%). Su estructura se caracteriza por ser una repetición de Cys-X-Cys o Cys- Cys y ausencia de aminoácidos aromáticos o hidrófobos (Figura 6).

Existe evidencia de la influencia de los metales pesados en el metabolismo secundario de las plantas. Algunos ejemplos son la disminución significativa en los niveles de antocianinas debida al estrés por Ni (Hawrylak, Matraszek & Szymańska, 2007) y el aumento en el contenido de aceites esenciales, por la acumulación de Cr, Fe, Zn y Mn en *B. juncea* de hasta alrededor de 35% (Singh & Sinha, 2010).

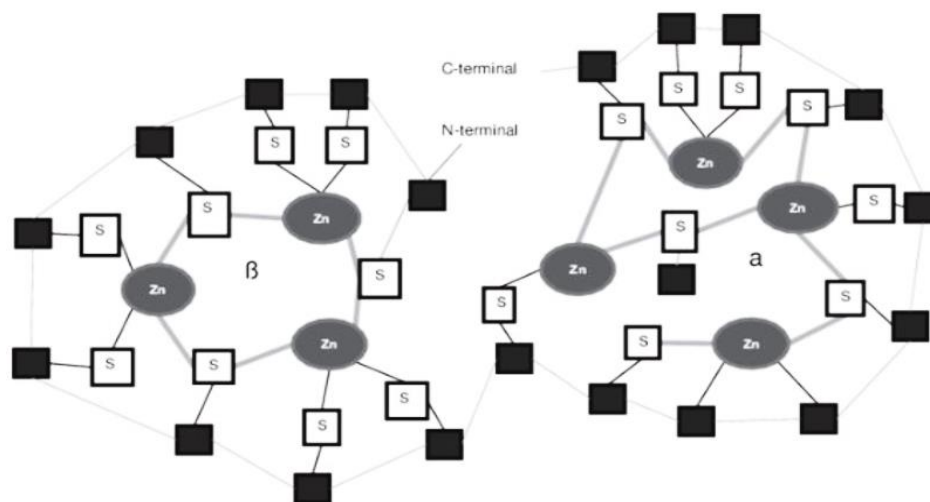


Figura 6. Estructura de una metalotioneína (MT). Los recuadros oscuros representan 20 residuos de cisteína (Cys) unidos a sulfuro (S) el cual se une de manera divalente al Zn u otro metal (Juárez-Rebollar & Méndez-Armenta, 2014).

Los tocoferoles son lípidos isoprenoides sustituidos sintetizados en los plástidos de plantas superiores, por lo que en estos sitios se encuentran en grandes cantidades. Son una de las primeras barreras de protección contra la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que tienen la capacidad de reaccionar con el 1O_2 (Singh et al., 2016). Los tocoferoles (vitamina E), betacarotenos (vitamina A), fenoles (flavonoides, taninos, lignina, entre otros) y un grupo de quinonas (vitamina K) junto con el GSH, son capaces de donar electrones a especies oxidadas como los radicales libres y los lipoperóxidos, neutralizando de esta manera el potencial oxidativo de estos (Mahajan & Tuteja, 2005).

También se ha reportado la síntesis y secreción de compuestos orgánicos para regular la disponibilidad de nutrientes y favorecer la detoxificación de metales no deseados; éstos compuestos reaccionan a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo con los iones metálicos principalmente con Cu y Fe (Chen et al, 2017). Para el caso del Pb se ha observado que plantas de *Zea mays* excretan ácidos fenólicos como ácido caféico y ferúlico (Drzewiecka et al., 2018), los cuales evitan la captación rápida de este metal (Chen, Wang & Yeh, 2017). En *Scirpus triquetra*, los ácidos orgánicos que participaron

en la desorción de Pb fueron ácido cítrico (65%), ácido succínico (25 %) y ácido glutárico 10% (Hou et al., 2015). Winkel-Shirley (2002) reportó la inducción de compuestos fenólicos en maíz por exposición a Al y Díaz, Caldas & Blair (2010) reportaron la acumulación en *Phaseolus vulgaris* expuestas a Cu.

Por otro lado, los sistemas antioxidantes enzimáticos involucran la activación de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), peroxidasa (PX) y las del ciclo ascorbato-glutatión o ciclo de Halleywell asada (AsA-GSH) (Figura 7). La SOD cataliza la conversión del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Muthukumarasamy, Gupta & Panneerselvam, 1999), en tanto que la CAT (en los peroxisomas) y POX (en el citosol y los cloroplastos) catalizan la transformación de H_2O_2 en H_2O y O_2 con la oxidación concomitante de AsA.

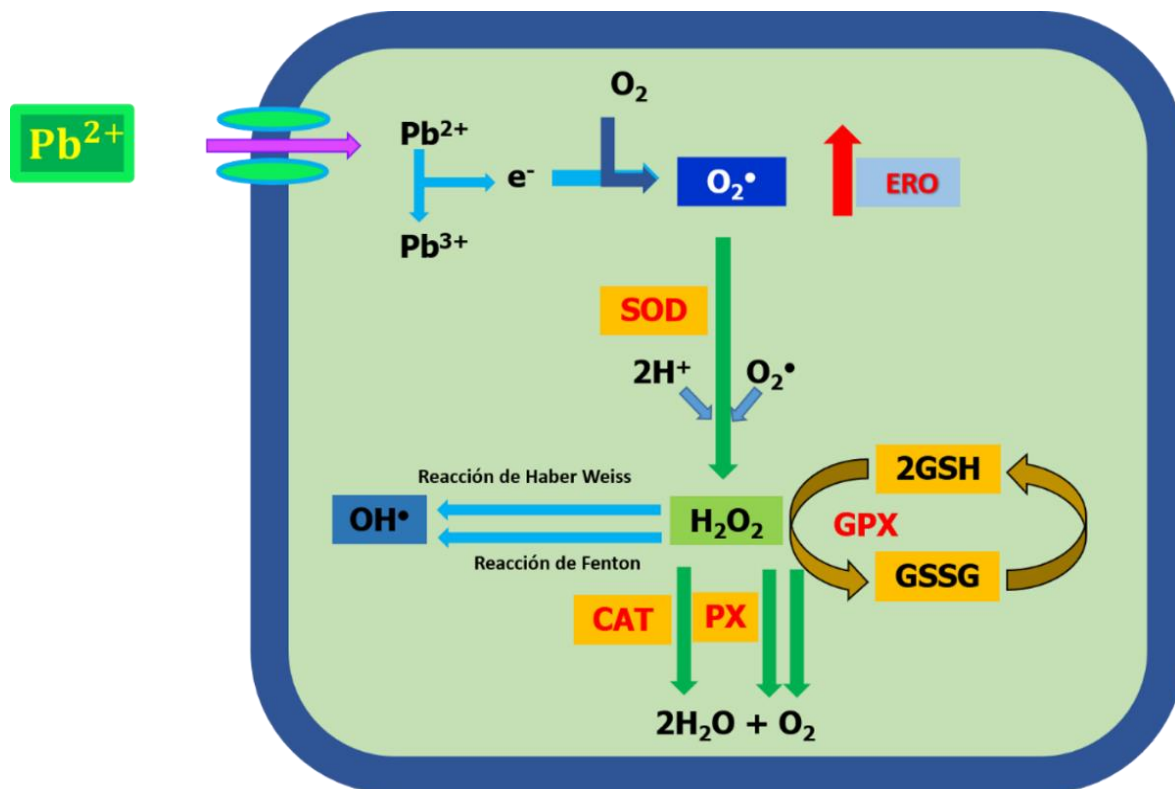


Figura 7. Generación de ERO por metales pesados (Pb^{2+}) y su eliminación por las enzimas antioxidantes CAT, SOD y POX así como la generación del GSH por acción de la GPX.

La peroxidasa (POX) de plantas (E. C. 1.11.1.7) está involucrada en funciones como la elongación celular, mecanismos de defensa y lignificación. Se han reportado dos isoformas, POX I y POX II (Suzuki, Honda, Mukasa, & Kim, 2005).

La superóxido dismutasa (SOD) (E. C. 1.15.1.1) incluye tres isoenzimas, Mn-SOD, Cu-Zn-SOD y Fe-SOD. La Mn-SOD se encuentra principalmente en mitocondria y peroxisomas, aunque también se ha reportado en citosol. La Cu-Zn-SOD se ha encontrado en citosol, cloroplastos y mitocondria. La Fe-SOD ha sido reportada predominantemente en los cloroplastos (Arora et al., 2002).

La catalasa (CAT) (E. C. 1.11.1.6) contiene Fe en su centro catalítico y se han reportado tres isoformas en *Zea mays*, CAT-1, CAT-2 y CAT-3 (Arora et al., 2002).

Las elevadas concentraciones de Pb incrementan la producción de ROS, por lo que se esperaría un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes, sin embargo estudios realizados en cultivos hidropónicos de *Phyllostachys pubescens*, *Iris halophila*, *Elsholtzia argyi*, *Spiraea japónica* y *Sesbania drummondii*, expuestos a diferentes concentraciones de Pb, mostraron que la actividad de las enzimas no siguió un patrón general si no que el comportamiento fue dependiente de la especie y de la concentración del metal (Zhong et al., 2017; Han et al., 2016; Islam et al., 2008; Ruley, Sharma, Sahi, Singh & Sajwan, 2006).

Una forma en que las plantas responden a la toxicidad por metales pesados para mantener la homeostasis es a través de la coordinación de la captación, neutralización, transporte y almacenamiento, funciones en las cuales participan proteínas que funcionan como transportadores. En la exposición a Pb se han identificado los siguientes:

- a) El LCT1 (low affinity cation transporter) que es un canal de calcio y que Wojas et al., (2007) sugirió participaba en la tolerancia a la toxicidad por Pb (TaLCT1). Varios autores han demostrado que la vía de entrada de los metales es a través de estos canales de calcio.
- b) La proteína mitocondrial CBP4, (proteína de unión a calmodulina), considerada la primera proteína reportada como involucrada en la tolerancia a Pb en *Nicotiana*

tabaccum por Arazi, Sunkar, Kaplan & Fromm (1999), que encontraron mediaba el transporte de Pb de la membrana plasmática al interior celular.

- c) La proteína PDR12, transportador del tipo ABC, que es una bomba de eflujo encontrada en la membrana plasmática, por Lee et al., (2005) utilizando plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* sobre-expresantes y no expresantes del gen.
- d) ATM3, proteína localizada en la membrana vacuolar, sobreexpresada en plantas de *A. thaliana* expuestas a Pb, sugiriendo su participación en la internalización a vacuolas (Kim et al., 2006; Morel et al., 2009).

La figura 8 muestra la localización de los transportadores.

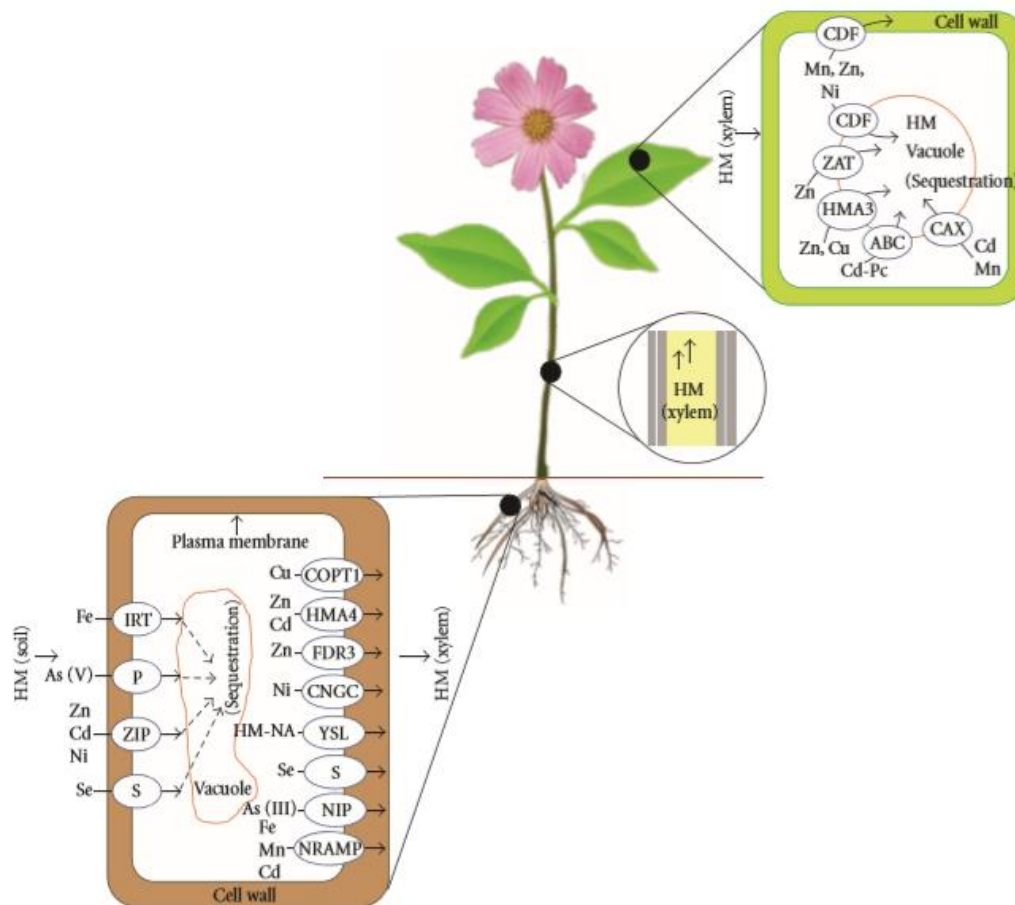


Figura 8. Transportadores identificados en la movilización e incremento de la tolerancia a metales (Tomado de Hossain et al., 2012)

Adicionalmente se ha encontrado que la presencia de micorrizas favorece la tolerancia a metales pesados como en *Viola tricolor* crecida en suelos con altas concentraciones de Fe, Zn y Pb (Słomka et al., 2008; Adedrian et al., 2016).

Otros factores que deben considerarse en los procesos de fitorremediación son el manejo post cosecha de los cultivos y las buenas prácticas agronómicas. En el primer caso existen varias alternativas de aprovechamiento de la biomasa residual, ya que ésta está constituida principalmente de lignina, hemicelulosa, celulosa y elementos minerales que representan materia de baja densidad de carga con gran valor calorífico. Esta biomasa puede tratarse por procesos como:

Compostaje y compactación. El primero consiste en acelerar el proceso de degradación de la biomasa transformándola en residuos orgánicos y es en general un proceso bio-oxidativo. El segundo se refiere a la disminución del volumen para facilitar su transporte reduciendo el riesgo del manejo de material contaminado. Ambos procesos son esenciales para un posterior tratamiento y recuperación del metal.

- a) Pirólisis. Es la descomposición química de la materia orgánica por calentamiento a altas temperaturas en ausencia de oxígeno. La primera ventaja de este proceso es la reducción del volumen, sin embargo, también pueden obtenerse subproductos de interés como combustibles.
- b) Combustión. Método que consiste en quemar la biomasa bajo condiciones controladas para reducir el volumen a menos del 5% para una adecuada disposición. No obstante, lleva consigo la generación de gases y liberación de partículas que pueden ser tóxicos.
- c) Gasificación. Proceso termoquímico donde a partir de la materia orgánica se obtiene un gas conocido como pyro-gas, syngas, gas de madera, gas pobre o gas de gasógeno que es de bajo poder calorífico en comparación con el gas natural, pero que puede utilizarse para generar electricidad o energía térmica. En la Figura 9 se resumen estos procesos.

Las buenas prácticas agronómicas consisten en: a) proporcionar a las plantas los nutrientes necesarios para que se mantengan en un estado fisiológico óptimo e incrementen su eficiencia, y b) manejar diferentes especies dentro de la misma

parcela, con el fin de mejorar el estado del suelo y obtener un mayor beneficio económico, a través de la obtención de productos secundarios como maderas y combustibles (Mohanty, 2016) (Figura 9).

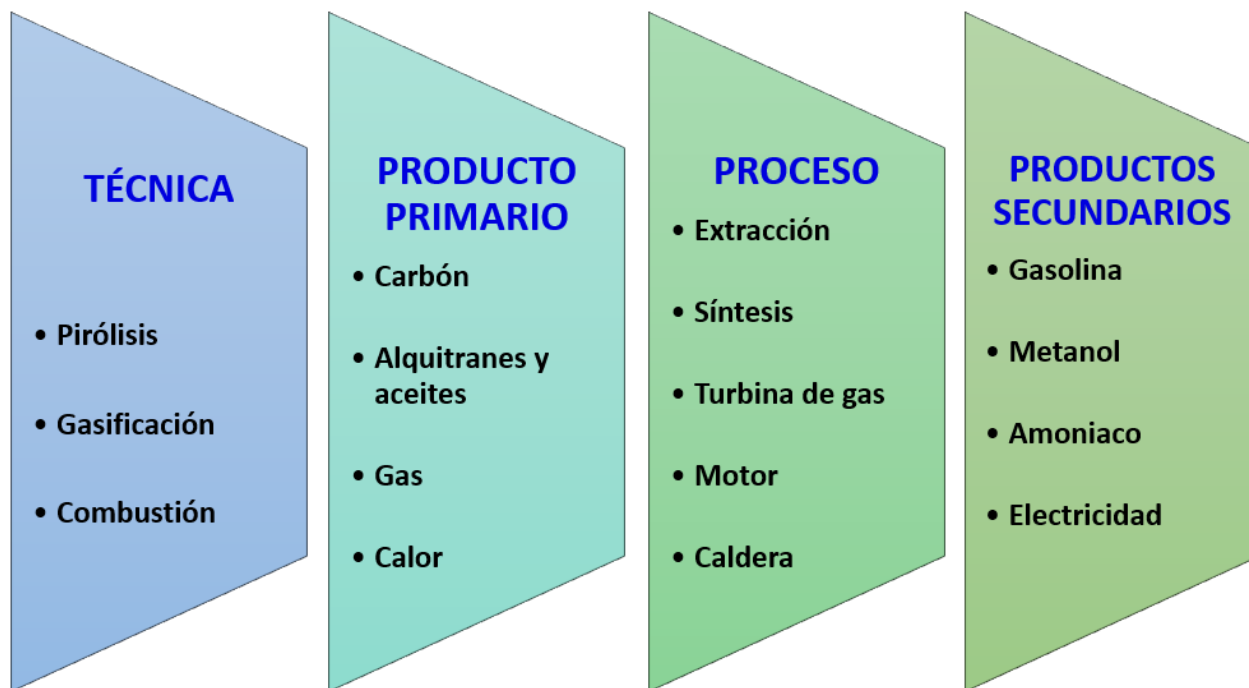


Figura 9. Técnicas para el aprovechamiento de la biomasa residual generada en procesos de fitorremediación (Mohanty, 2016).

1.4 Uso de técnicas de ingeniería genética para incrementar tolerancia a metales.

La ingeniería genética permite transferir y sobreexpresar los genes que promueven la hiperacumulación en plantas que tienen una gran biomasa (Lindsay & Maathuis, 2017). Un sistema muy usado para la transferencia de genes es la infección con *Agrobacterium rhizogenes*. Las plantas transformadas con esta bacteria presentan un fenotipo característico que incluye dominancia apical reducida en tallos y raíces, entrenudos acortados, hojas arrugadas y más anchas, formación de raíces adventicias, morfología alterada de las flores y polen y semillas reducidos. Estos síntomas combinados se denominan "fenotipo de raíz peluda". En 1985 White *et al.* identificaron los genes presentes en el ADN-T de *A. rhizogenes* involucrados en el

síndrome de raíz peluda llamándolos genes *rol* (de *rooting locus*) A, B, C y D. Estos genes causan la formación de tumores (enfermedad neoplásica) y de raíz vellosa. Su capacidad para cambiar el ciclo de desarrollo en la célula transformada llevó a los científicos a llamarlos oncogenes *rol* (Mauro, Costantino & Bettini, 2017).

El gen *rolA* causa enanismo en las plantas, arrugamiento de las hojas y es uno de los genes *rol* sin un papel claramente identificado. Su expresión se ha relacionado con una disminución de la hormona giberelina (G3). El gen *rolA* podría codificar para una proteína no integral asociada a la membrana. La homología estructural con el dominio de unión al ADN del virus E2 del papiloma sugiere que podría ser una proteína de unión al ADN (Mauro et al., 2017).

El gen *rolB* promueve la iniciación y elongación de la raíz, tiene una actividad de tirosina fosfatasa probablemente involucrada en las vías de transducción de señales relacionadas con la concentración y / o sensibilidad a las auxinas (Mauro, et al., 2017).

El gen *rolC* reduce la altura de la planta, genera hojas de color verde claro y una mayor ramificación. Se ha propuesto que *rolC* codifica para una β -glucosidasa capaz de liberar citocininas activas libres de sus conjugados glucosídicos inactivos (Mauro, et al., 2017). Los genes *rolB*, *rolC* y *rolA* inducen raíces en el tejido foliar en ausencia de fitohormonas añadidas.

El gen *rolD* induce precocidad en la floración, favorece la formación y elongación de la inflorescencia axilar, y una mayor producción y crecimiento de los meristemos adventicios de raíz. Este gen codifica una ornitina ciclodesaminasa, que cataliza la conversión de ornitina en prolina, por lo que se ha propuesto que es la prolina la responsable de favorecer el proceso de floración (Mauro, et al., 2017).

La agroinfección es probablemente la técnica más utilizada para la obtención de plantas transformadas genéticamente. Algunos ejemplos de plantas transformadas genéticamente se muestran en el Cuadro 2.

1.5 Uso de cultivos *in vitro* para la remoción de contaminantes.

Se ha descrito que no solo las plantas tienen capacidad de remover contaminantes sino también los cultivos *in vitro*. El cultivo de tejidos vegetales (CTV) se define como

el uso de células, tejidos y órganos, en medios de cultivo sintéticos y en condiciones controladas (Doran, 2009). A través del CTV puede generarse cultivos diferenciados como raíces y hojas los cuales se pueden propagar indefinidamente.

Además, en los cultivos *in vitro* se elimina la contaminación microbiana y se puede distinguir la respuesta intrínseca de las plantas sin la interferencia de los microorganismos normalmente presentes en la rizosfera (Doran, 2009). En los cultivos *in vitro* de plantas se pueden controlar las condiciones de crecimiento como temperatura, fotoperiodo y nutrición, y al usar plantas derivadas de la misma planta madre, se disminuye la variabilidad genética (Doran, 2009).

En general todos los medios de cultivo están compuestos por macronutrientes, como cloruro de calcio, nitrato de amonio y de potasio y de micronutrientes como sulfato de cobre, sulfato ferroso y ácido bórico, además de una fuente de carbono como la sacarosa o glucosa y vitaminas como el ácido nicotínico, piridoxina y tiamina.

Cuadro 2. Plantas modificadas genéticamente para incrementar su tolerancia a metales.

Gen	Especie donante	Planta modificada	Metal	Efecto	Referencia
tyMT	<i>Typha latifolia</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cu y Cd	Aumento de la tolerancia	Zhang et al. (2004)
PCS1 y GSH1	<i>Allium sativum</i> y <i>Saccharomyces cereviceae</i>	<i>A. thaliana</i>	As y Cd	Aumento de la acumulación	Guo, Dai, Xu, & Ma (2008)
iaaM y ACC	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> y <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Petunia hybrida</i> Vilm.	Co y Cu	Aumento de la tolerancia	Zhang et al. (2008)
NiCoT	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	<i>N. tabacum</i>	Ni y Co	Aumento de la acumulación	Nair et al. (2012)
YCF1	<i>S. cereviceae</i>	<i>A. thaliana</i>	Cd y Pb	Aumento de la acumulación en vacuolas	Song et al. (2003)
GST1 Y P450 2E1	<i>Homo sapiens</i>	<i>Medicago sativa</i> L.	Hg	Aumento de la tolerancia y de la acumulación	Zhang et al. (2013)
ACR2	<i>A. thaliana</i>	<i>N. tabacum</i> var Sumsun	As	Aumento de la tolerancia y de la acumulación en brotes	Nahar et al. (2017)
PttEXPA8	<i>Populus tormentosa</i> Carr. Cultivar TC1521	<i>N. tabacum</i>	Cd	Aumento de la tolerancia	Zhang et al. (2019)
GCS-GS y GSH1	<i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Zn	Aumento de la acumulación en brotes y raíces	Wonkaew et al. (2019)
VTE4	<i>Zea mays</i>	<i>N. tabacum</i>	Cd	Aumento de la tolerancia	Zhui et al. (2019)
NCED3	<i>Malus hupehensis</i>	<i>M. hupehensis</i> var. Pingyiensis y <i>A. thaliana</i>	Cd	Disminución de la captación	Zhang et al. (2019)
BTS (-)	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Cd	Aumento de la captación y en el crecimiento	Zhu et al. (2019)
HMA4	<i>B. juncea</i>	<i>A. thaliana</i>	Zn	Aumento de la captación de Zn y en la defensa antioxidante	Blasco, Navarro-León, & Ruiz (2019).

PRX38	<i>Oriza sativa</i>	<i>A. thaliana</i>	As	Disminución en la captación	Kidwai et al. (2019)
CAD3	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>A. thaliana</i>	Cd	Aumento de la tolerancia, de la acumulación y de la bioamsa	Qiu et al. (2018)
CDT1	<i>Iris lactea</i> var. <i>Chinensis</i>	<i>A. thaliana</i>	Cd	Disminución de la captación y aumento en la longitud de raíz	Gu et al. (2018)
APR2	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i> ecotipo Columbus	Cd	Aumento de la tolerancia, de la acumulación y de la defensa antioxidante	Xu, Wang, Xu & Xia, (2020)
UBQ2	<i>N. tabacum</i>	<i>N. tabacum</i> y <i>A. thaliana</i>	Cd	Disminución de la acumulación y mayor actividad del proteosoma y de las enzimas antioxidantes	Bahmani, Modareszadeh & Hwang (2019)
CCoAOMT	<i>Vicia sativa</i>	<i>A. thaliana</i>	Cd	Aumento en la tolerancia, captación, biomasa y translocación	Xia et al. (2018)
NRAMP3	<i>Sedum alfredii</i>	<i>Brassica juncea</i>	Cd	Aumento de la translocación	Feng et al. (2018)
CuZnSOD y APX	<i>Mahinot esculenta</i> y <i>Pisum sativum</i>	<i>Lolium arundinaceum</i>	Cu, Cd y As	Aumento de la tolerancia y disminución de ERO	Lee et al. (2007)
SAP	<i>Lobularia maritima</i>	<i>N. tabacum</i>	Cd, Cu, Mn y Zn	Aumento en la tolerancia, biomasa y longitud de raíz. Aumento en la actividad de enzimas antioxidantes SOD, CAT y POX.	Saad et al. (2018)

LEA4	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>B. napus</i>	As	Aumento en la acumulación de As	Nie et al. (2019)
TryS	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>O. sativa</i>	Cd*	Aumento en la tolerancia y biomasa. Disminución de ERO intracelular	Li et al. (2019)
bHLH105	<i>Z. mays</i>	<i>N. tabacum</i>	Mn	Aumento en la tolerancia y de la actividad antioxidante	Sun, Wang & Xia (2019)
EXPA2	<i>Triticum aestivum</i>	<i>A. thaliana</i>	Cd	Aumento en la biomasa, disminución de ERO y metal intracelular	Ren et al., (2019)
ATM3	<i>A. thaliana</i>	<i>B. juncea</i>	Pb	Incremento en expresión de BjGSHII y BjPCS1 e incremento de la tolerancia	Bhuiyan et al., (2011)

Uno de los componentes más importantes del medio de cultivo son los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) o fitohormonas, los cuales son compuestos orgánicos sintetizados por las propias plantas y que regulan los procesos de crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. La combinación de los RCV y la concentración produce diferentes resultados dependientes de la especie. Pueden generar callos, brotes, embriones somáticos o raíces. Dentro de los RCV más usados están las auxinas y las citocininas.

Las auxinas son compuestos derivados del triptófano, que se sintetizan en mayor medida en los ápices. La auxina natural más común es el ácido indolacético (AIA). En tejidos vegetales, las auxinas participan en la acidificación de la pared, crecimiento celular, el inicio de la división celular, formación de tejidos no diferenciados, diferenciación del tejido vascular y formación de órganos, como las raíces. En plantas completas, las auxinas participan en la dominancia apical, la senescencia y abscisión de hojas, además de coordinar algunas respuestas trópicas. Además del AIA, existen

otras auxinas, que se sintetizan dependiendo de factores como la edad de la planta, la estación del año y la especie, entre ellas están los ácidos 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA), indol-3-acrílico, fenilacético (PAA) y el indol butírico (AIB). También existen algunas auxinas sintéticas como el ácido naftalenacético (ANA) y el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). En la agricultura se aplican auxinas para mejorar procesos de propagación sexual, sujeción, crecimiento, caída y retención de frutos e incluso como herbicidas a altas concentraciones (Pérez- Molphe et al., 1999).

Las citocininas son derivados de la adenina y son sintetizadas en tejidos jóvenes y en raíces. Aplicadas a tejidos vegetales estimulan la división celular y favorecen la formación de brotes a partir de las yemas axilares. En plantas completas estimulan la expansión de las hojas y retardan la senescencia. Las citocininas naturales más comunes son la zeatina, isopentiladenina (2iP) y el ribósido de zeatina (ZEA) y algunas de origen sintético como la benciladenina (BA) y cinetina (CIN) (Pérez-Molphe et al.1999).

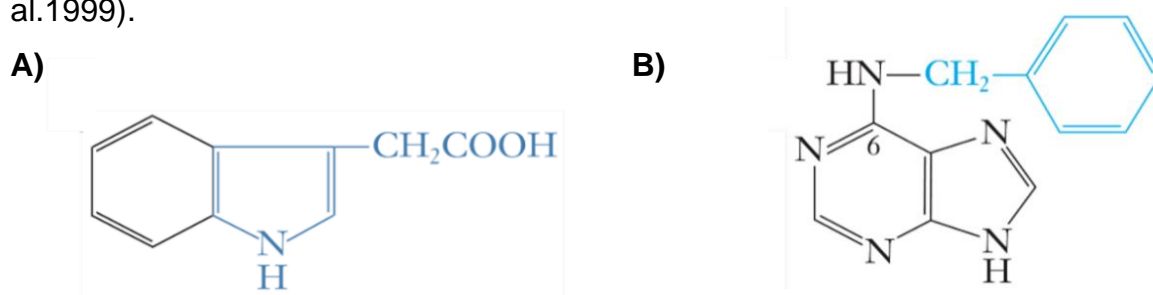


Figura 10. Estructura de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV). **A)** auxina: ácido indolacético (AIA) y **B)** citocinina): benciladenina (BA). La estructura base se presenta en color negro y la variable en azul.

Las vías para la regeneración de plantas *in vitro* incluyen la organogénesis y la embriogénesis somática. La organogénesis consiste en la formación *de novo* de órganos (raíces, brotes axilares, etc.) en los explantes cultivados. Este fenómeno se basa en la característica de totipotencialidad de las células, que le confiere a cada célula la información genética necesaria para regenerar una planta completa.

En condiciones normales este potencial no se expresa, por lo que es necesario generar las condiciones en los cultivos *in vitro*.

La organogénesis puede ser directa cuando tiene lugar en el explante original, o bien indirecta, cuando primeramente se origina tejido calloso y a partir de éste se forman los órganos (Pérez-Molphe et al., 1999).

Las condiciones en las que se mantienen los cultivos *in vitro* incluyen temperatura entre 20 y 30 °C, intensidad lumínica de 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

El cultivo de raíces fue uno de los primeros logros del CTV, siendo White en 1934 el primero en cultivar raíces de jitomate en condiciones totalmente artificiales.

Para iniciar el cultivo *in vitro* de raíces deben considerarse primero el genotipo, el medio de cultivo y las condiciones ambientales de cultivo. Dentro de los medios más utilizados destacan el Murashige y Skoog (1962) (MS) y el B5 (Gamborg, Miller & Ojima, 1968).

En el cultivo *in vitro* de raíces se utiliza medio líquido con agitación constante y suave para facilitar la dispersión de las células y la oxigenación o medios semisólidos (Dodds & Roberts, 1995).

Las raíces cultivadas *in vitro* se han usado con gran éxito en estudios de biotransformación y fitorremediación debido a su rápido crecimiento, su estabilidad genética y bioquímica y a su autotrofia hormonal. El Cuadro 3 muestra algunos ejemplos descritos en la literatura (Suresh y Ravishankar, 2004).

Cuadro 3. Remoción de metales por cultivos *in vitro* de “raíces peludas”

(Tomado de: Santos-Díaz, 2013)

Metal	Planta modificada	Referencia
Cd	<i>Calystegia sepium</i>	Metzger et al. (1992)
	<i>Solanum nigrum</i>	Macek et al. (1994)
	<i>Thlasppi caerulescens</i>	Nedelkoska y Doran (2000a)
	<i>Adenophora lobophylla</i>	Wu et al. (2001)
	<i>Adenophora potaninii</i>	
	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Boominathan y Doran (2003a, b)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	
Cu	<i>Hyptis capitata</i>	Nedelkoska y Doran (2000b)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	
	<i>Polycarpea longiflora</i>	
	<i>Euphorbia hirta</i>	
Ni	<i>Alyssum bertolonii</i>	Nedelkoska y Doran (2001)
	<i>Alyssum tenium</i>	Boominathan y Doran (2002, 2003b)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	
U	<i>Brassica juncea</i>	Eapen et al. (2003)
	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	
	<i>Armoracia rusticana</i>	Soudek et al. (2011)
	<i>Daucus carota</i>	Straczal et al. (2009)
Zn	<i>Solanum niger</i>	Suboroto et al. (2007)

II. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN E HIPOTESIS

2.1 Antecedentes

Entre las macrófitas emergentes se encuentra *Scirpus americanus*, de la familia *Cyperaceae*, también conocido como tule, totora o junco chico. Posee un rizoma con o sin escamas, del cual se desprenden múltiples tallos verdes. Los tallos pueden llegar hasta 1.5 m, son erectos, lisos y agudamente trígonos. La inflorescencia corresponde a un agregado pseudo-lateral que posee múltiples espiguillas sésiles. La Figura 11 muestra un esquema de la planta.

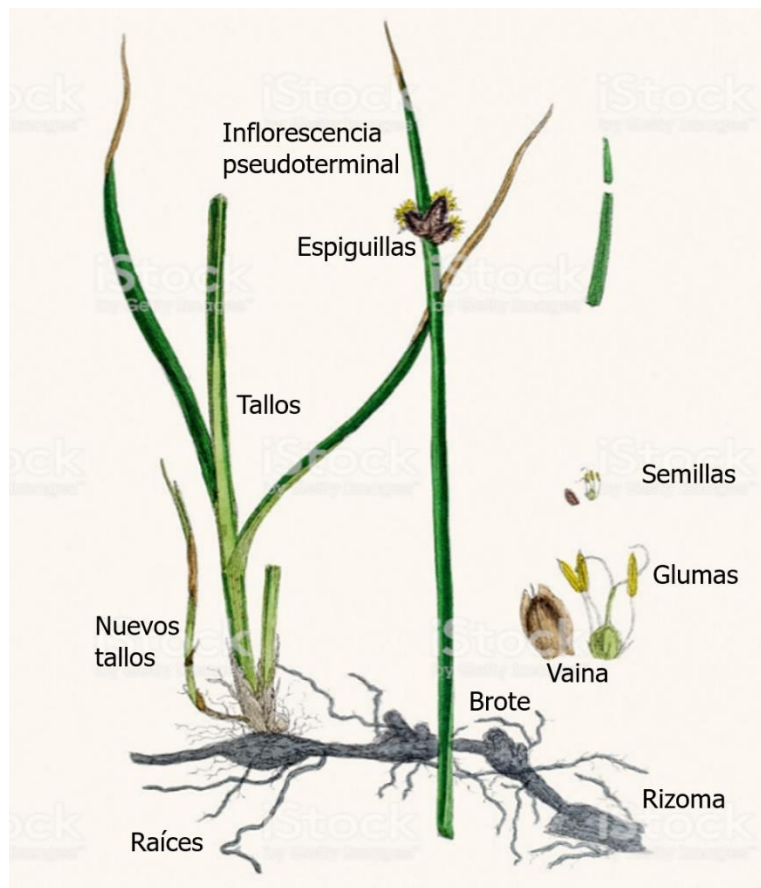


Figura 11. Morfología de *Scirpus americanus*.

El tule tiene una distribución cosmopolita, estando presente en zonas templadas y cálidas de América, Eurasia, Australia, Tasmania y Nueva Zelanda; se encuentra

en áreas abiertas permanentemente húmedas o frecuentemente inundadas, pantanos, cerca del nivel del mar o sitios densos alrededor de manantiales termales. Esta especie ha mostrado ser muy adaptable a los hábitats de los humedales costeros, encontrándose en espejos de agua, humedales, zonas arbustivas y gramadales, además de formar grandes comunidades denominadas vegas de ciperáceas. Asimismo, esta especie es capaz de resistir los cambios de estrés salino y habitar en múltiples zonas perturbadas como bordes de ríos y acequias (Aponte, 2009).

El tule posee dos tipos de reproducción: a) clonal, por medio de la propagación por rizomas que generan nuevos rametos, y b) sexual, por medio de flores. La reproducción sexual produce aquenios, que al germinar formarán plantas (genetos) con múltiples clones (rametos) unidos dentro del rizoma. En la base de los rametos aparecen las yemas caulinares que generan múltiples tallos. Las yemas caulinares promueven el crecimiento de los tallos en el rameto. La muerte de la yema caulinar permite el surgimiento de nuevos rametos, lo que a su vez permite la expansión clonal. Una vez llegada la época de floración el crecimiento de los tallos se detiene, hecho que ha sido documentado por medio de observaciones y evaluaciones de las poblaciones en campo. La fecundación produce frutos secos de tipo aquenio (procedente de un ovario con una única semilla y pericarpo delgado y no soldado a dicha semilla), los cuales al madurar se transforman en semillas (Bonilla-Barbosa & Santamaría, 2013).

Carranza-Álvarez, Alonso-Castro, Alfaro-De La Torre, & García-De La Cruz (2008) demostraron que las plantas de tule colectadas de una laguna artificial, conocida como Tanque Tenorio tienen la capacidad de acumular Pb, Cr, Cd y Mn, principalmente en sus raíces. Las concentraciones de Pb oscilaron entre 10 y 65 mg/Kg a lo largo de cuatro zonas de muestreo, demostrando la capacidad de estas plantas para su uso en procesos de fitorremediación.

Ya que las raíces de tule fueron los órganos principalmente involucrados en la remoción de metales, en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales se

establecieron cultivos *in vitro* de raíces de tule en medio MS con 2 mg/L de AIA y 0.1 mg/L de BAP.

Santos Díaz y Barrón Cruz (2011) reportaron que los cultivos *in vitro* de raíces removieron 148.3 $\mu\text{g/g}$, al exponerlas a 60 $\mu\text{g/L}$ de Pb, sin verse afectado su crecimiento.

Posteriormente Alfaro-Saldaña, Pérez-Molphe-Balch & Santos-Díaz (2016) transformaron genéticamente las raíces de tule mediante *Agrobacterium rhizogenes*, con el fin de incrementar la biomasa y capacidad de acumulación. Las raíces transformadas con fenotipo piloso (T12) (Figura 5A) acumularon 604 $\mu\text{g/g}$ de Pb y las no transformadas (N) 228 $\mu\text{g/g}$; además su crecimiento no se vio afectado por la presencia del metal. En este estudio también fue posible regenerar plantas completas a partir de las raíces transformadas (Figura 5B).

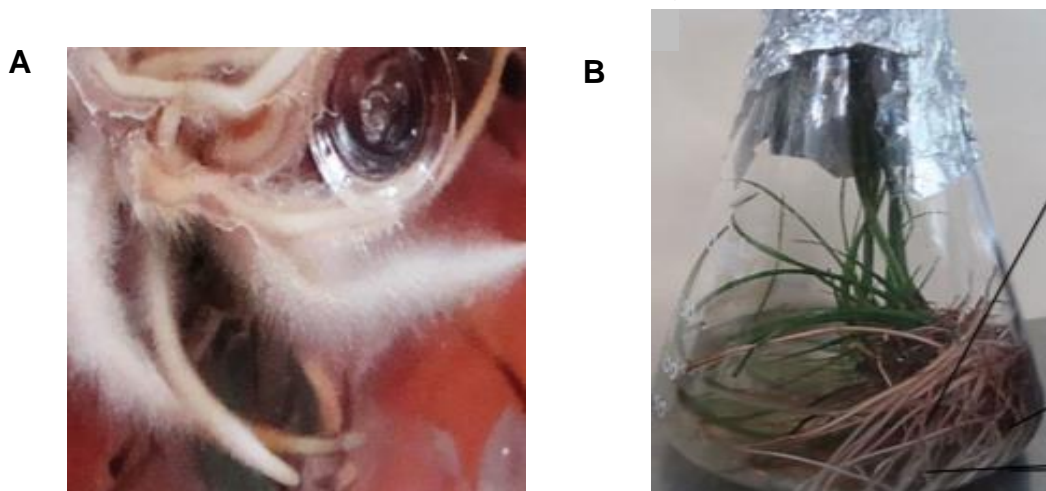


Figura 12. A) Raíces de tule transformadas con fenotipo piloso, **B)** planta regenerada de tule (línea T12)

2.2 Justificación

Existen reportes de ríos y cuerpos de agua en México donde se ha encontrado y cuantificado la presencia de metales, entre ellos Pb. Un ejemplo es el caso de los valles agrícolas de Puebla y la zona centro-norte del estado de Veracruz, donde desde hace más de 100 años se ha empleado el agua superficial contaminada para

riego. Ello ha ocasionado la acumulación de metales pesados en los suelos agrícolas que luego son captados por las plantas e ingeridos por la población a través del consumo de los cultivos (Flores et al., 2012). Igualmente, Gómez-Álvarez, Villalba-Atondo, Acosta-Ruíz, Castañeda-Olivares & Kamp (2004), encontraron valores superiores a los límites máximos permisibles para Pb en un afluente proveniente de una zona minera, aledaña al Río San Pedro, con concentraciones alrededor de 0.30 µg/mL. También se ha detectado una alta concentración de metales en el agua de ríos cercanos a las descargas de aguas residuales de ingenios azucareros (Mancilla et al., 2012), y cerca de las descargas de aguas urbano -industriales como el Tanque Tenorio en San Luis Potosí (Montante-Montelongo, 1998).

A pesar de que en México existen normas encaminadas a regular las concentraciones de metales presentes en agua y suelos, los métodos que se proponen para la remediación incluyen solo métodos fisicoquímicos. Éstos tienen algunas desventajas como elevado costo y la generación de lodos que deben ser recuperados y confinados para evitar un posible daño al medio, incrementando aún más el gasto económico.

Debido a que el Pb es un importante problema de contaminación a nivel mundial, es deseable contar con métodos eficientes y amigables con el medio ambiente que permitan remover el Pb del agua y disminuir el riesgo de exposición y los efectos sobre la salud de la población.

Se ha demostrado que las plantas transformadas tienden a remover más eficientemente los metales. En este proyecto se cuenta con plantas completas normales (N) y con la línea T12 que representan una opción interesante para estudiar y determinar la máxima capacidad de remoción de Pb y determinar el papel de los sistemas antioxidantes en sus mecanismos de tolerancia. Estas plantas posteriormente podrían usarse en procesos de fitorremediación de cuerpos de agua contaminados con este metal.

2.3 Hipótesis

Las plantas transformadas genéticamente tienen ventajas en su capacidad de tolerancia a metales con respecto de las plantas no transformadas debido a que poseen mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos eficientes lo cual le permite reducir el estrés oxidativo generado por la exposición a metales como el plomo.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar los mecanismos bioquímicos relacionados con la tolerancia al Pb en plantas normales y transformadas de tule cultivadas en medios hidropónicos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Establecer las condiciones de cultivo y propagación de plantas de tule en condiciones hidropónicas *ex vitro*.
- b) Determinar la máxima concentración de Pb que pueden tolerar las plantas normales y transformadas sin afectar su crecimiento y/o metabolismo (LD50).
- c) Analizar la capacidad de remoción, acumulación en la raíz y translocación de Pb en plantas expuestas a diferentes concentraciones del metal.
- d) Estimar la participación de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (PX), así como los niveles de GSH en la tolerancia de las plantas de tule al Pb.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Preparación de soluciones para ajustar pH

4.1.1 Solución de HCl 0.1 N

Se agregaron 3.08 mL de HCl concentrado a 950 mL de agua desionizada y se aforó a 1L con agua desionizada.

4.1.2 Solución de KOH 1.0 N

Se pesaron 14 g de KOH y se disolvió en 90 mL de agua desionizada, se aforó a 250 mL con agua desionizada.

4.1.3 Solución de NaOH 0.1 N

Se pesaron 0.4 g de NaOH y se disolvieron en 90 mL de agua desionizada, se aforó a 100 mL con agua desionizada.

4.2 Soluciones para lavado de material

4.2.1 Solución de HNO₃ al 10%

En un matraz volumétrico de 1 L se agregaron 100 mL de HNO₃ concentrado y posteriormente se aforó con agua desionizada.

4.2.2 Solución para lavado de tules

En un matraz volumétrico de 1 L se agregaron 5 mL de NaOCl concentrado comercial y posteriormente se aforó con agua de la llave y se agregaron 5 gotas de jabón líquido antibacterial.

4.3 Soluciones para la prueba histoquímica de detección del gen GUS

4.3.1 Buffer de fosfatos (sódico) 1.0 M pH 7.0

Se prepararon por separado las siguientes soluciones:

Solución A. Fosfato monobásico de sodio, Se pesaron 6.9 g de NaH₂PO₄ y disolvieron y aforaron a 100 mL con agua desionizada.

Solución B. Fosfato dibásico de sodio se pesaron 17.9 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, se disolvieron y aforaron a 100 mL con agua desionizada. Se mezclaron las dos soluciones y se verificó el pH a 7.0.

4.3.2 Buffer de fosfatos 0.1 M

Se colocaron 10 mL de buffer de fosfatos en un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con agua desionizada.

4.3.3 EDTA 0.25 M

Para 100 mL se pesaron 18.6 g de $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ y se disolvieron y aforaron a 100 mL con buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.0.

4.3.4 Ferrocianuro de potasio [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] 5mM

Para 50 mL se pesaron 0.823g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, se disolvieron y aforaron a 50 mL con buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.0.

4.3.5 Ferricianuro de potasio [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$] 5mM

Se pesaron 0.1056 g de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, se disolvieron y aforaron a 50 mL con buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.0.

4.3.6 Tritón al 10 %

Se midieron 10 mL de Tritón-X100, se disolvieron y aforaron en matraz volumétrico a 100 mL con buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.0.

4.3.7 X-Gluc 40 mM

Se pesaron 5.2 mg de X-Gluc (ácido 5-bromo-4 cloro-3 indoil- β -D glucurónico; Phytotechnology Labs.) y se disolvieron en 250 μL de dimetilformamida (Sigma-Aldrich) concentrada.

Para la cuantificación de la actividad de la β -glucuronidasa, se realizó la mezcla de reacción como se indica en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Reacción para la detección histoquímica del gen reportero GUS

Solución	Volumen (μ L)	Concentración final (mM)
Buffer de fosfatos 1 M	100	100
EDTA 0.25 M	40	10
$K_3Fe(CN)_6$ 5Mm	100	0.5
$K_4Fe(CN)_6$ 5mM	100	0.5
Tritón 10%	10	0.1%
X-Gluc 40 mM	50	2.0
Agua desionizada	600	
TOTAL=	1000	

4.4 Solución para desorción de Pb

4.4.1 Solución de HNO_3 0.042%

Se agregó agua desionizada en un matraz volumétrico de 1 L hasta la mitad aproximadamente, luego se añadieron 420 μ L de ácido nítrico concentrado, lentamente, dejando resbalar por la pared y finalmente se aforó con agua desionizada.

4.5 Soluciones para cuantificación de Pb

4.5.1 Solución de HNO_3 al 0.5% (v:v)

A 900 mL de agua desionizada se agregaron 5 mL de HNO_3 y se mezclaron y aforaron a 1 L con agua desionizada.

4.5.2 Curva de calibración estándar de Pb

Para realizar la curva de calibración estándar de Pb se utilizó una solución patrón de Pb a 1000 ppm y se prepararon soluciones estándar de 100 mL en matraces volumétricos aforando con HNO_3 al 0.5% (v:v).

De esta solución patrón se preparó *la "solución estándar 1"* a 100 ppm de Pb colocando 10 mL del patrón de 1000 ppm en matraz y aforando a 100 mL.

De la anterior solución, se realizó una dilución 1 a 10 para obtener la “solución estándar 2” a 10 ppm, tomando 10 mL y aforando a 100 mL.

A partir de estas soluciones se prepararon 100 mL de los estándares restantes como se indica en el siguiente cuadro:

Cuadro 5. Preparación de soluciones estándar para la curva de calibración de Pb en el espectrofotómetro de flama

Concentración (ppm)	Volumen de estándar	Estándar
0.1	1	2
0.3	3	2
0.5	5	2
1.0	10	2
3.0	3	1
5.0	5	1
10	10	1
15	15	1
30	30	1

4.6 Reactivos para extracción de proteínas y su cuantificación

4.6.1 Buffer de fosfato de sodio y potasio 0.1 M, pH 7.0

Se prepararon por separado las soluciones A y B.

Solución A. Se pesaron 3.405 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) se disolvieron en suficiente agua desionizada y se aforaron a 500 mL.

Solución B. Se pesaron 3.549 g de fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) del reactivo, se disolvieron en suficiente agua desionizada y se aforaron a 500 mL.

Para obtener el buffer a pH 7.0 se mezclaron disolvieron las soluciones en proporción 1:1.5, respectivamente.

4.6.2 Buffer de extracción de proteínas (BEP)

Se utilizó buffer de extracción cuya composición se indica en el siguiente cuadro:

Cuadro 6. Preparación de buffer de extracción de proteínas (BEP)

Solución	Cantidad	Concentración final (mM)
Buffer de fosfatos 1.0 M	996 mL	100
EDTA 0.166 M	4 mL	10
TOTAL=	1000 mL	

Antes de realizar la extracción agregar la cantidad necesaria de PVP para una concentración del 2% (p/p) (0.01 g/0.5 g de tejido vegetal) y disolver en el volumen deseado de buffer.

4.6.3 Reactivo de Bradford

Se pesaron 100 mg de azul de Coomassie G-250 y se colocaron en un matraz volumétrico de 1 L, se agregaron 50 mL de etanol absoluto y 100 mL de ácido fosfórico (en ese orden) y se mantuvo en agitación hasta su disolución. Se aforó con agua desionizada y se filtró con filtro de papel Whatman No.1. Se almacenó en un frasco ámbar en refrigeración.

4.6.4 Albúmina de suero bovino fetal (BSA) 1 mg/mL

Se pesaron 50 mg de BSA (Sigma- Aldrich), se colocaron en matraz volumétrico de 50 mL, se disolvió y aforó con BEP. Se almacenó en refrigeración.

4.7 Reactivos para la determinación de la actividad de la SOD

4.7.1 Buffer de carbonatos 0.1 M a pH 10.2

Se prepararon por separado las soluciones A y B. Para obtener un pH de 10.2 se disolvieron 17 mL de la solución A y 27.6 mL de la solución B se aforó con agua desionizada a 1L.

Solución A. Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0.1M

Se pesaron 8.4 g del reactivo y se disolvieron en suficiente cantidad de agua para posteriormente aforar a 100 mL.

Solución B. Carbonato de sodio (Na_2CO_3) 0.1M

Se pesaron 10.6 g del reactivo y se disolvieron en suficiente cantidad de agua para posteriormente aforar a 100 mL.

4.7.2 L-metionina 0.1 M

Se pesaron 0.149 g de L-metionina y se agregaron a un vaso de precipitado, se añadieron 3 mL de agua desionizada, se agitó hasta disolver completamente y se llevó a un volumen final de 10 mL.

4.7.3 Azul de nitrotetrazolium (NBT) 0.01 M

Se pesaron 8.17 mg del reactivo, se disolvieron y aforaron a 1 mL con agua desionizada.

4.7.4 Riboflavina 0.01 mM

Se preparó un estándar a 1 mM, con 3.76 mg de riboflavina disueltos en agua desionizada el cual se almacenó a 4°C al abrigo de la luz hasta su uso. La solución de trabajo a 0.01 mM se preparó antes de iniciar las pruebas con 10 μL del estándar de B2 1mM y aforando a 10 mL con agua desionizada.

Cuadro 7. Buffer de reacción para la determinación de la actividad de la SOD

Solución	Volumen (μL)
Buffer de carbonato 1.0 M	500
L-metionina 0.1 M	120
NBT 10 mM	10
Riboflavina 10 μM	100
Muestra / Blanco	270
TOTAL=	1000

4.8 Reactivos para la determinación de actividad de CAT

4.8.1 Buffer de fosfato de sodio y potasio 0.1 M, pH 6.5

Se prepararon por separado las soluciones A y B.

Solución A. Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4). Se pesaron 3.405 g

Solución B. Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4). Se pesaron 3.549 g del reactivo

Ambos se disolvieron en suficiente agua desionizada y se aforaron a 500 mL.

Se mezclaron las soluciones en proporción 1:1.5, respectivamente.

4.8.2 H_2O_2 120 mM

Se midieron y disolvieron 136 μL de H_2O_2 al 30% en 10 mL de agua desionizada.

Cuadro 8. Reacción para la determinación de la actividad de la CAT

Solución	Blanco	Muestra
Buffer de fosfatos (Na-K) 0.1 M, pH 6.5	1 mL	----
Extracto protéico (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	2 mL	2 mL
H_2O_2 120 mM	----	1 mL
<i>TOTAL=</i>	3 mL	3 mL

4.9 Reactivos para la determinación de actividad de POX

4.9.1 Buffer citrato-fosfato 50 mM a pH 5.0

Para preparar 100 mL de solución se pesaron 0.365 g de ácido cítrico y 0.593 g de Na_2HPO_4 , se disolvieron en 40 mL de agua desionizada por separado, después se mezclaron y se ajustó el pH a 5.0, finalmente se aforó a 100 mL. Se filtró y almacenó a 4°C hasta su uso.

4.9.2 H_2O_2 5 mM

Se disolvieron 51 μL de la solución de H_2O_2 al 30% en agua desionizada y se llevaron a 10 mL.

4.9.3 ABTS 5 mM

Se pesaron 5.48 mg por cada mililitro a preparar y se disolvió en agua desionizada. Se almacenó a -20°C hasta su uso, manteniéndose al abrigo de la luz y evitando ciclos de congelación-descongelación.

Cuadro 9. Buffer de reacción para la determinación de la actividad de la POX

Solución	Volumen (µL)
Buffer citrato-fosfato, 50 mM pH 5.0	200
ABTS 10mM	100
H ₂ O ₂ 5 mM	100
Agua desionizada	550
Muestra / Blanco	50
TOTAL=	1000

4.10 Reactivos para la cuantificación de GSH total (kit de detección colorimétrica (Invitrogen No. EIAGSHC)

4.10.1 Reactivo de color

Para 192 reacciones se disolvieron 500 µL del reactivo de color proporcionado en el kit en 4.5 mL de buffer de ensayo (kit).

4.10.2 Acido 5-sulfosalicílico (ASS) al 5% (P/V)

Se pesó 1 g de ácido 5-sulfosalicílico dihidratado, se disolvió en agua desionizada y se aforó a 20 mL.

4.10.3 Solución de dilución (ASS) al 1% (v/v)

Se disolvieron 10 mL de ASS al 5% en 40 mL del buffer de ensayo y se mezclaron vigorosamente. Se verificó que el pH fuera mayor a 6.0 y se almacenó en refrigeración. Esta solución debe almacenarse por un mes máximo.

4.10.4 Preparación de curva de calibración estándar

Para el estándar No. 1, a concentración de GSH total de 25 μM , se colocaron 475 μL de la solución de dilución (ASS 1%) en un tubo de ensaye y se añadieron 25 μL del estándar de GSSG 250 μM para una medición indirecta de GSH (1 GSSG = 2 GSH). Posteriormente se hicieron cinco diluciones seriadas 1:2, con 250 μL de solución de dilución y 250 μL de la solución estándar correspondiente.

Así los estándares de calibración fueron: 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 y 0.781 250 μM de GSH total.

4.10.5 Preparación de mezcla de reacción

Se agitó perfectamente cada una de las soluciones proporcionadas en el kit.

Para 192 reacciones se colocaron 500 μL de NADPH concentrado, más 500 μL de Glutación Reductasa concentrada en un tubo con 4 mL de solución de dilución y se mezclaron perfectamente en vórtex. Esta se almacenó en refrigeración a 4 $^{\circ}\text{C}$ por no más de dos días.

Cuadro 10. Reacción para la determinación concentración de GSH total

Solución	Volumen (μL)
Muestra / estándar	50
Reactivo de color	25
Mezcla de reacción	25
TOTAL=	100

4.11 Soluciones para preparación de medios

4.11.1 Soluciones para medio Murashige y Skoog (MS)

Solución I. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 22 g disueltos en 50 mL de agua desionizada.

Solución II. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9.25 g; KH_2PO_4 , 4.25 g disueltos en 250 mL de agua desionizada.

Solución III. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.557 g; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.744 g disueltos en 100 mL de agua desionizada.

Solución IV. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.54 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.86 g; H_3BO_3 0.62 g, KI 0.083 g, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.025g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0025 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0025 g disueltos en 100 mL de agua desionizada.

Solución V. Glicina 0.05 g, piridoxina HCl 0.0125 g, tiamina HCl 0.0025 g, mio-inositol 2.5 g y ácido nicotínico 0.0125 g disueltos en 250 mL de agua desionizada.

Las soluciones se filtraron y almacenaron a 4°C, excepto la V, que se almacenó a -20°C.

4.11.2 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)

4.11.2.1 Ácido indol 3-acético (AIA), 1 mg/mL

Se disolvieron 50 mg de AIA en 10 mL de KOH 1 N y se aforaron a 50 mL con agua desionizada.

4.11.2.2 Bencil Amino Purina (BAP), 1 mg/mL

Se disolvieron 50 mg de BAP en 10 mL de HCl 1 N y se aforaron a 50 mL con agua desionizada.

4.11.3 Soluciones para medio hidropónico modificado

Para preparar las siguientes soluciones la cantidad que se indica a continuación se disolvió y aforó con agua desionizada en matraz volumétrico de 100 mL.

Solución de KNO_3 , 2M. 20.2 g de KNO_3 .

Solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2M. 47.2 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Solución de NH_4NO_3 , 1M. 8 g de NH_4NO_3 .

4.11.4 Solución estándar de Pb a 300 mg/mL (300,000 ppm)

El peso molecular del compuesto es 331.20 g/mol y el del Pb es 207.2 g/mol el Pb, es decir, solo el 62.56% de la masa del compuesto es Pb, por lo que se tiene un 37.44% faltante que se debe agregar.

Para preparar 100 mL de estándar se pesaron 47.95 g de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y se disolvieron y aforaron con HNO_3 al 0.5 % en matraz volumétrico de 100 mL

4.12 Preparación de medios de cultivo

4.12.1 Medio MS sólido

Para preparar 1L de se añadieron a un recipiente aproximadamente 800 mL de agua desionizada y se agregaron 1 mL de solución I, 10 mL de solución II, 5 mL de solución III, 1 mL de solución IV y 10 mL de solución V. Luego se disolvieron 1.9 g de KNO₃, 1.65 g de NH₄NO₃ y 30 g de sacarosa, se ajustó el pH a 7.0 con KOH 1N o HCl 1.0 N y se aforó a 1 L. Finalmente se agregaron 8.4 g de agar (Phytotechnology Lab), se fundió y se vació el medio en frascos. Los frascos con medio se esterilizaron en autoclave a 120°C y 15 lb/pulgada² por 20 min. Se verificó en uno de los frascos que el pH final fuera de 5.7. Posteriormente, los frascos se sellaron con vitafilm y almacenaron hasta su uso.

4.12.2 Medio MS líquido

El medio se preparó como se indica en el apartado anterior pero no se añadió el agar. Se vació en matraces (previamente lavados con HNO₃ al 10%) sellados con doble hoja de papel aluminio y se esterilizó en autoclave.

4.12.3 Medio MS con AIA y BAP semisólido

Para preparar 1L de medio se añadieron los reactivos y soluciones como se indica en la preparación de medio MSy posteriormente se agregaron 2 mL de la solución stock de AIA y 0.1 ml de la solución stock de BAP. El pH se ajustó a 7 con KOH 1N y se agregaron 4.2 g de Agar Plant (Phytotechnology Labs), se fundió y vació y finalmente se esterilizó en autoclave. El pH final el medio fue 5.7.

4.13 Medio hidropónico

4.13.1 Medio de mantenimiento de tules

Se utilizó el medio hidropónico comercial en polvo de la marca Hydroenvironment. Se agregaron 1.5 g por litro de medio (pH inicial, de 6.8) y se ajustó con HCl 0.1N hasta 5.7.

4.13.2 Medio modificado

Para preparar 1 L de medio se agregó a un recipiente aproximadamente 800 mL de agua desionizada y posteriormente 2.5 mL de la solución de KNO_3 , 2.5 mL de la solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y 1 mL de la solución de NH_4NO_3 . Las concentraciones en el medio fueron 5, 3 y 1 mM respectivamente.

4.13.3 Medio con diferentes concentraciones de exposición a Pb

Para los experimentos de exposición a Pb se utilizó el medio modificado y se agregó Pb como nitrato $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Se añadieron 0.33, 0.93 y 1.33 mL por litro de medio Hoagland modificado para tener 100, 250 y 400 ppm, respectivamente. Se agregó una gota de HNO_3 concentrado para disminuir el pH y luego se ajustó el pH a 5.7 con KOH 1.0 M, una vez ajustado el pH, se aforó a 1 L con agua desionizada.

4.14 Lavado de material

Los frascos de conserva se lavaron con agua corriente y detergente comercial, se enjuagaron, se dejaron secar y se colocaron en una estufa a 200°C durante 2 horas. Los matraces se lavaron de la misma manera y después se sumergieron en una solución de HNO_3 al 10% durante 24 horas, se enjuagaron con abundante agua corriente y posteriormente con agua desionizada. Se cubrieron con doble hoja de papel aluminio cuidando que llegara debajo de la mitad del matraz y que no quedaran bordos que pudieran permitir el flujo de aire del exterior al interior.

Las tapaderas de los frascos de conserva se lavaron con detergente comercial, se enjuagaron y posteriormente se dejaron sumergidas en una solución de NaOCl al 1% durante 24 horas. Se dejaron secar al aire libre.

Todo el material de vidrio se esterilizó en autoclave a 120°C y 15 lb/pulgada² durante 20 minutos. El material se protegió del polvo almacenándose en bolsas de plástico. Los contenedores de plástico para los cultivos hidropónicos se lavaron con detergente comercial y se enjuagaron antes de su uso y cada vez que se cambió el medio.

4.20 Determinación de la dosis de Pb en cultivos hidropónicos de tule

Plantas de tule normales y transformadas de aproximadamente 50 cm de altura de tallo se colocaron en palanganas conteniendo 2 L de medio hidropónico modificado con 0, 100, 250 y 400 ppm de Pb, pH 5.7. En estos cultivos se evaluaron cada 2 días,

durante 12 días, los siguientes parámetros: a) longitud de tallo y de raíz, la cual se realizó con la ayuda de un flexómetro; b) presencia de clorosis de forma cualitativa, considerando de 0 a 1 cuando las plantas tienen un color verde intenso, de 1 a 1.5 cuando son verde claro, de 2 a 2.5 cuando presentan color amarillo y de 3 a 3.5 cuando tienen evidente oxidación.

4.21 Cuantificación de peso fresco y seco

Para calcular el valor del peso fresco, el material vegetal se secó sobre papel absorbente hasta que se observó que ya no había humedad sobre el papel. La planta completa se colocó dentro de una probeta y posteriormente se obtuvo su peso en balanza granataria. Se registró el peso fresco (PF) tarando el peso de la probeta. Este parámetro se midió al inicio (día 0) y al final del experimento (día 12).

El peso seco se midió después de secar el material vegetal en horno a 80°C durante 48 horas hasta que alcanzó un peso constante (PS) Se registró el peso seco a tiempo inicial y final (0 y 12 días).

4.22 Concentración de clorofila, pH y temperatura

Se tomaron tres muestras de tejido fresco, (200 mg aproximadamente) y se maceraron en mortero con 5 mL de acetona fría al 80% en H₂O (v:v). Se centrifugaron a 2096 g durante 4 minutos. Se separó el sobrenadante y se aforó a 10 mL con acetona al 80%. Se cuantificó la absorbencia a 663, 645 y 662 nm en el espectrofotómetro Nanodrop 2000.

La clorofila total se calculó como:

$$\text{Clorofila total} = 27.8 \times \text{Absorbancia a 652 nm}$$

Y para calcular la concentración en mg/100 g de tejido fresco:

$$\text{Clorofila (mg/100 mg de tejido)} = \frac{CV100}{1000 P}$$

Donde

C = Concentración (mg/L)

V = Volúmen de aforo (mL)

P = Peso de la muestra

1000 = Factor de conversión de mg/L a mg/mL

El pH se midió cada 2 días a partir del tiempo 0. Se utilizó un potenciómetro marca DENVER INSTRUMENTS, Modelo UB-10. El potenciómetro se calibró cada vez que se realizó la medición.

Se midió también la temperatura sumergiendo en el medio un termómetro de mercurio.

4.23 Cuantificación de plomo Pb en el medio y en tejido vegetal

Para asegurar que el Pb cuantificado correspondiera solo al internalizado se realizó una desorción de las paredes de las raíces utilizando HNO₃ al 0.042% en una relación de 3 mL por cada 0.5 g de peso fresco de raíz.

El tejido se mantuvo en agitación por una hora y posteriormente se retiró. La solución de desorción y el tejido se trataron de la forma correspondiente, como se describe a continuación.

Para cuantificar el plomo en el medio, se tomaron muestras de 10 mL de cada palangana y cada tratamiento. Se acidificaron con 3 µL/mL de HNO₃ concentrado y se filtraron con membranas HDPE (0.22 µM de diámetro de poro). Las muestras se almacenaron en frascos de HDPE.

Para determina el Pb en el tejido vegetal se pesaron 20 mg de material seco y se añadió 1 mL de HNO₃ concentrado y se mantuvieron en frascos HPDE protegidos de la luz y el polvo durante cinco días a 25°C. Para optimizar la degradación del material orgánico, la digestión ácida se extendió 24 h con la adición de 400 µL de H₂O₂ (30% v:v) a 25 °C. Finalmente, el volumen se ajustó a 5 mL con agua desionizada.

La concentración de Pb en el medio y en el tejido se analizó utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica de flama de aire:acetileno (Varian-SpectrAA 3110, Palo Alto, CA). El control de calidad del análisis se realizó cuantificando el metal en una muestra de agua de referencia (control interno de laboratorio).

4.24 Cinética de remoción de Pb

Para la realización de este experimento se utilizó en el medio una concentración de 40 y 400 ppm de plomo. Se colocaron cinco plantas normales o de la línea T12 en cinco palanganas con 2 L de medio de Hoagland modificado. Se colectaron cinco plantas a los tiempos 0, 2, 4, 6 y 8 días. Se separó el 50% de la biomasa de raíces y tallos y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para cuantificar posteriormente las actividades enzimáticas. El 50% restante se congeló y almacenó a -20 °C para la cuantificación de Pb.

4.25 Obtención de los extractos enzimáticos

Después de realizar el muestreo el tejido se pesó y almacenó en nitrógeno líquido en paquetes de 0.5 g hasta su uso. Al momento de la realización del extracto todos los materiales y reactivos se utilizaron fríos. Las muestras de tejido vegetal se homogenizaron en mortero con 3 mL de buffer de extracción BEP y se sometieron a tres ciclos de sonicación de un minuto y un minuto de descanso a una amplitud de 60%. Se recuperó la muestra total en tubos cónicos de 15 mL y el volumen se ajustó a 3 mL. Las muestras se centrifugaron en refrigeración a 4 °C y el sobrenadante se almacenó a 4°C por no más de un día para la determinación de las actividades enzimáticas.

4.26 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para la cuantificación se mezclaron 65 µL de muestra (problema, estándar o blanco), 265 µL de BEP y 670 µL de reactivo de Bradford y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos para posteriormente leer la absorbancia a 595 nm.

Para realizar la curva de calibración con BSA, a partir del estándar de BSA a 1 mg/mL se realizaron siete diluciones seriadas 1:2 en microtubos de 2 mL utilizando una micropipeta de 1000 µL. Primero se colocaron 750 µL mL de BEP en cada tubo. Para la primera dilución se tomaron 750 µL del estándar inicial (1 mg/mL) y se mezclaron con ayuda de la pipeta. De esta primera dilución se tomaron 750 µL y se mezclaron en

el siguiente tubo con BEP, y así sucesivamente para tener 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.0156 y 0.0078 mg/mL de proteína.

La concentración de las muestras se calculó por interpolación con la curva de calibración de BSA diluida en BEP y utilizando la ecuación de la recta. Cada medición se realizó por triplicado, verificando los parámetros de linealidad y repetibilidad. Cada vez que se cuantificaron las proteínas en las muestras se realizó la curva de calibración.

4.27 Cuantificación de la actividad antioxidante

La concentración de proteína total de todas las muestras se ajustó a 50 µg/mL y posteriormente se midió la actividad de cada enzima.

4.27.1. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

Para esta determinación se utilizó el método fotoquímico de Giannopolitis & Ries (1977). La mezcla de reacción se realizó como se indicó previamente.

Todas las muestras, incluyendo los blancos se prepararon por duplicado, una fue almacenada y protegida de la luz y la otra expuesta a iluminación con lámparas fluorescentes de 25W por 7 minutos. Después de este tiempo de incubación se realizó la medición de la absorbancia a 560 nm de ambas muestras.

Para obtener la actividad específica (A. E.) de esta enzima se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{A_{\text{blanco iluminado}} - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco no iluminado}})}{A_{\text{blanco iluminado}}} \times 100$$
$$U = \frac{V}{v} - 1$$

Donde V corresponde a la absorbancia del blanco iluminado y v a la absorbancia de la muestra menos el blanco no iluminado.

4.27.2 Actividad de la catalasa (CAT)

La actividad total de la CAT se midió según el método de Hodges & Forney (2001). Se utilizaron 2 mL el extracto proteico y la reacción se inició con 1 mL de H₂O₂ 120 mM. Para el blanco se colocaron 2 mL de extracto a 50 µg/mL y 1 mL de buffer de fosfatos y se midió la absorción. La actividad se determinó midiendo la descomposición de H₂O₂ a 240 nm, tomando lecturas a tiempo cero y posteriormente cada 15 segundos hasta llegar a los 60 segundos.

4.27.3 Actividad de la peroxidasa (POX)

Se utilizó el método descrito por Condori (2008) realizando la reacción como se indicó anteriormente y se midió la absorbancia a 414 nm tomándose ésta como tiempo cero y la final a los tres minutos.

La actividad para CAT y POX se obtuvo según la ecuación:

$$U = \left(\frac{\Delta Abs}{t(min)} \right) \left(\frac{1}{\epsilon} \right) \left(\frac{V_{TOTAL}}{V_{extracto}} \right)$$

Donde U= Unidad de actividad total

ΔAbs = Incremento de la absorbancia ($Abs_{t_{final} (min)} - Abs_{t_{0min}}$)

ϵ = 26.6 mM⁻¹cm⁻¹ para POX y 39.4 mM⁻¹cm⁻¹ para CAT

V_{TOTAL} = Volumen final de la reacción

$V_{extracto}$ = Volumen de extracto utilizado para la reacción

La actividad enzimática específica (A. E.) para todas las enzimas se calculó como:

$$AE = \frac{U}{\text{mg de proteína}}$$

4.27.4 Cuantificación de glutatión (GSH) total

Para esta determinación se ajustó la concentración a 15 µg de proteína en 50 µL de buffer SSA 1%, esperando obtener una absorbancia de alrededor de 0.1 U. A. a 405 nm.

La reacción se realizó como se mencionó previamente, utilizando una placa de 96 pozos. Se mezcló dando ligeros golpes y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Como blanco se utiliza la solución de dilución (SSA1%).

VI. CONCLUSIONES

1. Se logró la adaptación exitosa *ex vitro* en medio hidropónico comercial de las plantas de tule N y línea T12 regeneradas *in vitro*.
2. Fue necesario usar medios modificados para evitar la precipitación del Pb a las concentraciones de 100, 200 y 400 ppm.
3. El crecimiento de la raíz y tallo de plantas N y línea T12 disminuyó a partir del día 8 debido aparentemente a una deficiencia de nutrientes más que a la presencia de Pb.
4. La máxima concentración de Pb tolerada por las plantas N y línea T12 fue a 400 ppm.
5. El mecanismo de captación de Pb en plantas N y T12 fue por rizofiltración.
6. La máxima acumulación de Pb en la raíz fue de 53,430 ppm en plantas N y 39,740 ppm en la línea T12.
7. Se observó una importante reducción en el pH del medio en presencia de Pb lo que sugiere que las plantas están excretando ácidos orgánicos como mecanismo de defensa.
8. Las plantas N y T12 fueron capaces de bioacumular en sus tejidos 387 ppm y 272 ppm, respectivamente.
9. La línea T12 translocó 3.8 y 1.4 veces más metal que las plantas N en presencia de 40 y 400 ppm, respectivamente.
10. La exposición a Pb indujo una mayor actividad de SOD, CAT y GSH en las raíces de plantas N expuestas a Pb con relación al control, en tanto que en los tallos solo aumentó el GSH.
11. En las raíces de la línea T12 expuestas al metal, aumentaron los niveles de SOD y GSH, mientras que en los tallos solo se incrementó el GSH.

VII. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos consideramos que el trabajo abre una amplia gama de posibilidades para estudios futuros, entre los cuales podemos citar los siguientes:

- Utilizar buenas prácticas agronómicas para establecer las condiciones de cultivo óptimas (nutrientes, iluminación, pH y temperatura) a fin de incrementar la biomasa de las plantas de tule y con ello promover la translocación de metal a las partes aéreas.
- Evaluar la capacidad de remoción de tule bajo condiciones ambientales reales.
- Estudiar la supervivencia y capacidad de remoción del tule ante una combinación de contaminantes.
- Identificar los genes involucrados en la tolerancia al Pb para utilizarlos como una herramienta de ingeniería genética.
- Evaluar la capacidad de tule en la acumulación de metales de interés comercial (biominería).
- Establecer el procedimiento de compostaje adecuado (post-cosecha) de la biomasa residual de tule.
- Evaluar la capacidad de producción de subproductos de interés comercial, como energía térmica, syngas o la recuperación de los metales acumulados.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Adediran, G. A., Ngwenya, B. T., Mosselmans, J. F., Heal, K. V., & Harvie, B. A. (2016). Mixed planting with a leguminous plant outperforms bacteria in promoting growth of a metal remediating plant through histidine synthesis. *International journal of phytoremediation*, 18(7), 720–729. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1131235>
- Aide, M. T., & Braden, I. S. (2018). Lead sequestration in the soil environment with an emphasis on the chemical thermodynamics involving phosphate as a soil amendment: Review and simulations. *International J. Applied Agricultural Research*, 13, 9-19.
- Alfaro-Saldaña, E. F., Pérez-Molphe-Balch, E. & Santos-Díaz, M. S. (2016). Generation of transformed roots of *Scirpus americanus* Pers. And study of their potential to remove Pb^{2+} and Cr^{3+} . *Plant Cell and Tissue Organ Culture* 127, 15-24. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00588.x>
- Aponte, H. (2009). El junco. Clasificación, Biología y gestión. *Revista Científica*, 6(1).
- Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B., & Fromm, H. (1999). A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni^{2+} tolerance and Pb^{2+} hypersensitivity in transgenic plants. *The Plant Journal*, 20(2), 171-182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00588.x>
- Arora, A., Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science*, 82(10), 1227-1238.
- Bahmani, R., Modareszadeh, M., Kim, D., & Hwang, S. (2019). Overexpression of tobacco UBQ2 increases Cd tolerance by decreasing Cd accumulation and oxidative stress in tobacco and *Arabidopsis*. *Environmental and Experimental Botany*, 166, 103805. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103805>
- Barceló, J., & Poschenrieder, C. (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta*, 2(2), 345-361.
- Barton, C., Marx, D., Adriano, D., Koo, B. J., Newman, L., Czapka, S., & Blake, J. (2005). Phytostabilization of a landfill containing coal combustion waste. *Environmental Geosciences*, 12(4), 251-265. <https://doi.org/10.1306/eg.06210404021>
- Bhuiyan, M. S. U., Min, S. R., Jeong, W. J., Sultana, S., Choi, K. S., Lee, Y., & Liu, J. R. (2011). Overexpression of *AtATM3* in *Brassica juncea* confers enhanced heavy metal tolerance and accumulation. *Plant Cell, Tissue and*

Organ Culture (PCTOC), 107(1), 69-77. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9958-y>

- Blasco, B., Navarro-León, E., & Ruiz, J. M. (2019). Study of Zn accumulation and tolerance of HMA4 TILLING mutants of *Brassica rapa* grown under Zn deficiency and Zn toxicity. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 287, 110201. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110201>
- Bonilla-Barbosa, J. R., & Santamaría, B. (2013). Plantas acuáticas exóticas y trasladadas invasoras. R. Mendoza y P. Koleff (coords.). *Especies acuáticas invasoras en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México*, 223-247.
- Bothe, H., & Słomka, A. (2017). Divergent biology of facultative heavy metal plants. *Journal of plant physiology*, 219, 45-61. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.08.014>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Burke, D. J., Weis, J. S., & Weis, P. (2000). Release of metals by the leaves of the salt marsh grasses *Spartina alterniflora* and *Phragmites australis*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 51(2), 153-159. <https://doi.org/10.1006/ecss.2000.0673>
- Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A. J., Alfaro-De La Torre, M. C., & García-De La Cruz, R. F. (2008). Accumulation and distribution of heavy metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an artificial lagoon in San Luis Potosí, México. *Water, air, and soil pollution*, 188(1-4), 297-309. <https://doi.org/10.1007/s11270-007-9545-3>
- Charlesworth, S., De Miguel, E., & Ordóñez, A. (2011). A review of the distribution of particulate trace elements in urban terrestrial environments and its application to considerations of risk. *Environmental geochemistry and health*, 33(2), 103-123. <https://doi.org/10.1007/s10653-010-9325-7>
- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S. K., & Joner, E. (2005). Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment (15 pp). *Environmental Science and Pollution Research*, 12(2), 34-48. <https://doi.org/10.1065/espr2004.08>

- Chen, Y. T., Wang, Y., & Yeh, K. C. (2017). Role of root exudates in metal acquisition and tolerance. *Current opinion in plant biology*, 39, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.06.004>
- Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant physiology*, 123(3), 825-832. <https://doi.org/10.1104/pp.123.3.825>
- Condori, M.G., Garcia, M.P., Siles, E.T., & Turba, A.G. (2008). Growth, oxidase and peroxidase activity in *Galipea longiflora* K. callus cultured in MS medium, varying concentrations of sucrose, nitrogen and phosphate. *BIOFARBO* 16, 42-46.
- Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., & Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(2), 597-612.
- Díaz A.M., Caldas G.V. & Blair M. (2010) Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. *Food Research International*, 43 (2): 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.014>
- Dinh, N., van der Ent, A., Mulligan, D. R., & Nguyen, A. V. (2018). Zinc and lead accumulation characteristics and in vivo distribution of Zn²⁺ in the hyperaccumulator *Noccaea caerulea* elucidated with fluorescent probes and laser confocal microscopy. *Environmental and Experimental Botany*, 147, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.10.008>
- Dodds J.H. & Roberts L.W. (1995). *Experiments in plant tissue culture*, 2a Ed, Press Syndicate of University of Cambridge, New York, 1985, 94-103 pp.
- Doran P. M. (2009). Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. *Biotechnology and bioengineering*, 103(1), 60–76. <https://doi.org/10.1002/bit.22280>
- Drzewiecka, K., Gąsecka, M., Rutkowski, P., Magdziak, Z., Goliński, P., & Mleczek, M. (2018). Arsenic forms and their combinations induce differences in phenolic accumulation in *Ulmus laevis* Pall. *Journal of plant physiology*, 220, 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.09.013>
- Dushenkov, V., Nanda- Kumar, P. B. A., Moto, H., y Raskin, I. (1995). Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental. Science & Technology*, 29, 1239-1245.
- Estrella-Gómez, N., Mendoza-Cózatl, D., Moreno-Sánchez, R., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Martínez-Hernández, A., & Santamaría, J. M. (2009).

- The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb(2+) by increasing phytochelatin synthesis via changes in SmPCS expression and in phytochelatin synthase activity. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 91(4),320–328. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.11.002>
- Feng, Y., Wu, Y., Zhang, J., Meng, Q., Wang, Q., Ma, L., Ma, X & Yang, X. (2018). Ectopic expression of SaNRAMP3 from *Sedum alfredii* enhanced cadmium root-to-shoot transport in *Brassica juncea*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 156, 279-286. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.031>
- Flores-Ramirez, R., Rico-Escobar, E., Nunez-Monreal, J. E., Garcia-Nieto, E., Carrizales, L., Ilizaliturri-Hernandez, C., & Diaz-Barriga, F. (2012). Children exposure to lead in contaminated sites. *Salud pública de Mexico*, 54(4), 383-392.
- Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151-158.
- Gerhardt, K. E., Gerwing, P. D., & Greenberg, B. M. (2017). Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. *Plant Science*, 256, 170-185. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.11.016>
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59(2), 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gómez-Álvarez, A., Villalba-Atondo, A., Acosta-Ruiz, G., Castañeda-Olivares, M., & Kamp, D. (2004). Metales pesados en el agua superficial del Río San Pedro durante 1997 y 1999. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 20(1), 5-12.
- Grill, E., Winnacker, E. L., & Zenk, M. H. (1985). Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230(4726), 674-676. <https://doi.org/10.1126/science.230.4726.674>
- Gu, C., Liu, L., Song, A., Liu, Z., Zhang, Y., & Huang, S. (2018). Iris lactea var. chinensis (Fisch.) cysteine-rich gene IICDT1 enhances cadmium tolerance in yeast cells and Arabidopsis thaliana. *Ecotoxicology and environmental safety*, 157, 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.059>

- Guo, J., Dai, X., Xu, W., & Ma, M. (2008). Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, 72(7), 1020-1026. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.018>
- Gupta, D. K., Huang, H. G., Yang, X. E., Razafindrabe, B. H. N., & Inouhe, M. (2010). The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatins but the glutathione. *Journal of hazardous materials*, 177(1-3), 437-444. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.052>
- Gupta, D. K., Huang, H. G., & Corpas, F. J. (2013). Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(4), 2150-2161. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1484-4>
- Han, Y., Zhang, L., Yang, Y., Yuan, H., Zhao, J., Gu, J., & Huang, S. (2016). Pb uptake and toxicity to *Iris halophila* tested on Pb mine tailing materials. *Environmental Pollution*, 214, 510-516. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.048>
- Hawrylak, B., Matraszek, R., & Szymańska, M. (2007). Response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to selenium in nutrient solution contaminated with nickel. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 67(1), 63-70.
- Heiss, S., Wachter, A., Bogs, J., Cobbett, C., & Rausch, T. (2003). Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *Journal of Experimental Botany*, 54(389), 1833-1839. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg205>
- Hodges, D. M., Forney, C. F., & Wismer, W. V. (2001). Antioxidant responses in harvested leaves of two cultivars of spinach differing in senescence rates. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(5), 611-617. <https://doi.org/10.21273/JASHS.126.5.611>
- Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2012). Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/872875>
- Hou, Y., Liu, X., Zhang, X., Chen, X., Tao, K., Chen, X., Liang X. & He, C. (2015). Identification of *Scirpus triquetra* root exudates and the effects of organic acids on desorption and bioavailability of pyrene and lead in co-contaminated wetland soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), 17780-17788. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4995-4>

- Islam, E., Liu, D., Li, T., Yang, X., Jin, X., Mahmood, Q., Shengke T. & Li, J. (2008). Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1-3), 914-926. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.121>
- Jabeen, R., Ahmad, A., & Iqbal, M. (2009). Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanisms. *The Botanical Review*, 75(4), 339-364. <https://doi.org/10.1007/s12229-009-9036-x>
- Jain, S. K., Vasudevan, P., & Jha, N. K. (1990). *Azolla pinnata* R. Br. and *Lemna minor* L. for removal of lead and zinc from polluted water. *Water Research*, 24(2), 177-183. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90100-K](https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90100-K)
- Juárez-Rebollar, D., & Méndez-Armenta, M. (2014). Aspectos funcionales de la metalotioneína en el sistema nervioso central. *Archivos de Neurociencias*, 19(1), 34-41.
- Kabala, C., & Singh, B. R. (2001). Fractionation and mobility of copper, lead, and zinc in soil profiles in the vicinity of a copper smelter. *Journal of Environmental Quality*, 30(2), 485-492. <https://doi.org/10.2134/jeq2001.302485x>
- Kidwai, M., Dhar, Y. V., Gautam, N., Tiwari, M., Ahmad, I. Z., Asif, M. H., & Chakrabarty, D. (2019). *Oryza sativa* class III peroxidase (OsPRX38) overexpression in *Arabidopsis thaliana* reduces arsenic accumulation due to apoplastic lignification. *Journal of hazardous materials*, 362, 383-393. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.09.029>
- Kim, D. Y., Bovet, L., Kushnir, S., Noh, E. W., Martinoia, E., & Lee, Y. (2006). AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 140(3), 922-932. <https://doi.org/10.1104/pp.105.074146>
- Kim, K. R., Owens, G., Naidu, R., Kwon, S. I., & Kim, K. H. (2009). Lead induced organic acid exudation and citrate enhanced Pb uptake in hydroponic system. *한국환경농학회지 제*, 28(2).
- Kushwaha, A., Hans, N., Kumar, S., & Rani, R. (2018). A critical review on speciation, mobilization and toxicity of lead in soil-microbe-plant system and bioremediation strategies. *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 1035-1045. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.049>
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E. W., & Lee, Y. (2005). AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 138(2), 827-836. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058107>

- Lee, S. H., Ahsan, N., Lee, K. W., Kim, D. H., Lee, D. G., Kwak, S. S., Kwon S. Y., Kim T. H. & Lee, B. H. (2007). Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *Journal of plant physiology*, 164(12), 1626-1638. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.003>
- Leifert, C., Murphy, K. P., & Lumsden, P. J. (1995). Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(2), 83-109. <https://doi.org/10.1080/07352689509701923>
- León, C. E., & Esteban, J. P. (2012). Aplicación de compuestos orgánicos en la recuperación de suelos contaminados con metales pesados. *ENSEÑANZA Y DIVULGACIÓN*, 189.
- Li, Z. R., Wang, J. X., An, L. Z., Tan, J. B., Zhan, F. D., Wu, J., & Zu, Y. Q. (2019). Effect of root exudates of intercropping *Vicia faba* and *Arabis alpina* on accumulation and sub-cellular distribution of lead and cadmium. *International journal of phytoremediation*, 21(1), 4-13. <https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1523867>
- Lindsay, E. R., & Maathuis, F. J. (2017). New molecular mechanisms to reduce arsenic in crops. *Trends in plant science*, 22(12), 1016-1026. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.015>
- Liu, C., Zhu, J., Liu, Z., Li, L., Pan, R., & Jin, L. (2002). Exogenous auxin effects on growth and phenotype of normal and hairy roots of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Plant Growth Regulation*, 38(1), 37-43. <https://doi.org/10.1023/A:1020904528045>
- Liu, D., Li, S., Islam, E., Chen, J. R., Wu, J. S., Ye, Z. Q., Peng, D., Yan, W., & Lu, K. P. (2015). Lead accumulation and tolerance of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) seedlings: applications of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 16(2), 123-130.
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.018>
- Mancilla-Villa, Ó. R., Ortega-Escobar, H. M., Ramírez-Ayala, C., Uscanga-Mortera, E., Ramos-Bello, R., & Reyes-Ortigoza, A. L. (2012). Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(1), 39-48.

- Manual Para El Manejo Ambientalmente Responsable De Plomo, Cámara Minera de México, 2015
- Mauro, M. L., Costantino, P., & Bettini, P. P. (2017). The never-ending story of rol genes: a century after. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131(2), 201-212. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1277-5>
- Mbila, M. O., & Thompson, M. L. (2004). Plant-available zinc and lead in mine spoils and soils at the mines of Spain, Iowa. *Journal of environmental quality*, 33(2), 553-558. [ps://doi.org/10.2134/jeq2004.5530](https://doi.org/10.2134/jeq2004.5530)
- Mendoza-Cózatl, D. G., Butko, E., Springer, F., Torpey, J. W., Komives, E. A., Kehr, J., & Schroeder, J. I. (2008). Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *The Plant Journal*, 54(2), 249-259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03410.x>
- Miranda, M. G., & Quiroz, A. (2013). Efecto del fotoperiodo en la remoción de plomo por *Lemna gibba* L(Lemnaceae). *Polibotánica*, (36), 147-161.
- Mohanty, M. (2016). Post-harvest management of phytoremediation technology. *J Environ Anal Toxicol*, 6(5), 398.
- Montante-Montelongo, A. D. (1998). *Estudio geoquímico de metales traza en una laguna artificial de aguas residuales* (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S. LP, México).
- Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A., & Richaud, P. (2009). AtHMA3, a P1B-ATPase allowing cd/Zn/co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(2), 894-904.
- Movahed, N. M., & Mohammad, M. (2009, September). Phytoremediation and sustainable urban design methods (Low Carbon Cities through Phytoremediation). In *45th ISOCARP Congress*. (Vol. 4)
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Muthukumarasamy, M., Gupta, S. D., & Panneerselvam, R. (2000). Enhancement of peroxidase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase activities by triadimefon in NaCl stressed *Raphanus sativus* L. *Biologia Plantarum*, 43(2), 317-320. <https://doi.org/10.1023/A:1002741302485>

- Nahar, N., Rahman, A., Nawani, N. N., Ghosh, S., & Mandal, A. (2017). Phytoremediation of arsenic from the contaminated soil using transgenic tobacco plants expressing ACR2 gene of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology*, 218, 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.08.001>
- Nair, S., Joshi-Saha, A., Singh, S., Ramachandran, V., Singh, S., Thorat, V., Kaushik C. P., Eapen S& D'Souza, S. F. (2012). Evaluation of transgenic tobacco plants expressing a bacterial Co–Ni transporter for acquisition of cobalt. *Journal of biotechnology*, 161(4), 422-428. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.191>
- Navarro-Aviñó, J. P., Alonso, I. A., & López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Revista Ecosistemas*, 16(2).
- Nie, L., Shah, S., Rashid, A., Burd, G. I., Dixon, D. G., & Glick, B. R. (2002). Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(4), 355-361. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01375-X](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01375-X)
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>
- Olguín, E. J., Hernández, E., & Ramos, I. (2002). The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. *Acta Biotechnologica*, 22(1-2), 121-131. [https://doi.org/10.1002/1521-3846\(200205\)22:1/2<121::AID-ABIO121>3.0.CO;2F](https://doi.org/10.1002/1521-3846(200205)22:1/2<121::AID-ABIO121>3.0.CO;2F)
- Oliveros-Bastidas, A. D. J., Macías, F. A., Fernández, C. C., Marín, D., & Molinillo, J. M. (2009). Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. *Química nova*, 32(1), 198-213.
- OMS (Agosto 23, 2019), Intoxicación por plomo y salud, Mensaje publicado en <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>.
- Pedranzani, H., Racagni, G., Alemano, S., Miersch, O., Ramírez, I., Peña-Cortés, H., Taleisnik E., Machado-Domenech E. & Abdala, G. (2003). Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation*, 41(2), 149-158. <https://doi.org/10.1023/A:1027311319940>

- Pérez Molphe-Balch E. *et al.*, *Introducción al cultivo de tejidos vegetales*, 1a Ed., Departamento de Procesos Gráficos de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, 1999, 9-96 pp.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., & Malecka, A. (2002). Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry*, *60*(2), 153-162. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00067-5)
- Pignocchi, C., & Foyer, C. H. (2003). Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current opinion in plant biology*, *6*(4), 379-389. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00069-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00069-4)
- Porter, S. K., Scheckel, K. G., Impellitteri, C. A., & Ryan, J. A. (2004). Toxic metals in the environment: thermodynamic considerations for possible immobilization strategies for Pb, Cd, As, and Hg. *Critical reviews in environmental science and technology*, *34*(6), 495-604. <https://doi.org/10.1080/10643380490492412>
- Ren, Y., Chen, Y., An, J., Zhao, Z., Zhang, G., Wang, Y., & Wang, W. (2018). Wheat expansin gene TaEXPA2 is involved in conferring plant tolerance to Cd toxicity. *Plants Science*, *270*, 245-256. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01>
- Ruley, A. T., Sharma, N. C., Sahi, S. V., Singh, S. R., & Sajwan, K. S. (2006). Effects of lead and chelators on growth, photosynthetic activity and Pb uptake in *Sesbania drummondii* grown in soil. *Environmental pollution*, *144*(1), 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.016>
- Saad, R. B., Hsouna, A. B., Saibi, W., Hamed, K. B., Brini, F., & Ghneim-Herrera, T. (2018). A stress-associated protein, LmSAP, from the halophyte *Lobularia maritima* provides tolerance to heavy metals in tobacco through increased ROS scavenging and metal detoxification processes. *Journal of plant physiology*, *231*, 234-243. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.09.019>
- Santos-Díaz, M. D. S., & Barrón-Cruz, M. D. C. (2011). Lead, chromium and manganese removal by in vitro root cultures of two aquatic macrophytes species: *Typha latifolia* L. and *Scirpus americanus* pers. *International journal of phytoremediation*, *13*(6), 538-551. <https://doi.org/10.1080/15226511003671379>
- Santos-Díaz, M. S. (2013). Metal remediation via in vitro root cultures. En *Plant-based remediation processes* (pp. 101-115). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35564-6_6

- Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M. R., Ishaque, W., Kamran, M. A., Matloob, A., Rehin A., & Hussain, S. (2017). Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171,710-721. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116>
- Simón, M., Martín, F., Ortiz, I., Garcia, I., Fernández, J., Fernández, E. & Aguilar, J. (2001). Soil pollution by oxidation of tailings from toxic spill of a pyrite mine. *Science of the Total Environment*, 279(1-3), 63-74. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00726-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00726-4)
- Singh, S., & Sinha, S. (2005). Accumulation of metals and its effects in *Brassica juncea* (L.) Czern.(cv. Rohini) grown on various amendments of tannery waste. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(1), 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.12.026>
- Smirnoff, N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current opinion in plant biology*, 3(3), 229-235. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)80070-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)80070-9)
- Song, W. Y., Sohn, E. J., Martinoia, E., Lee, Y. J., Yang, Y. Y., Jasinski, M., Forestier C., Hwang I., & Lee, Y. (2003). Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nature biotechnology*, 21(8), 914-919.
- Srivastava, N. K., & Majumder, C. B. (2008). Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *Journal of hazardous materials*, 151(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.101>
- Sun, K., Wang, H., & Xia, Z. (2019). The maize bHLH transcription factor bHLH105 confers manganese tolerance in transgenic tobacco. *Plant science*, 280, 97-109. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.006>
- Suresh, B., & Ravishankar, G. A. (2004). Phytoremediation—a novel and promising approach for environmental clean-up. *Critical reviews in biotechnology*, 24(2-3),97-124. <https://doi.org/10.1080/07388550490493627>
- Suzuki, T., Honda, Y., Mukasa, Y., & Kim, S. J. (2006). Characterization of peroxidase in buckwheat seed. *Phytochemistry*, 67(3), 219-224. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.014>
- Talebi, M., Tabatabaei, B. E. S., & Akbarzadeh, H. (2019). Hyperaccumulation of Cu, Zn, Ni, and Cd in *Azolla* species inducing expression of methallothionein

- and phytochelatin synthase genes. *Chemosphere*, 230, 488-497. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.098>
- Vogel-Mikuš, K., Drobne, D., & Regvar, M. (2005). Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (*Brassicaceae*) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution*, 133(2), 233-242.
- White, F. F., Taylor, B. H., Huffman, G. A., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1985). Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of bacteriology*, 164(1), 33-44.
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 218-223. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X)
- Wojas, S., Ruszczyńska, A., Bulska, E., Wojciechowski, M., & Antosiewicz, D. M. (2007). Ca²⁺-dependent plant response to Pb²⁺ is regulated by LCT1. *Environmental Pollution*, 147(3), 584-592. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.012>
- Wongkaew, A., Nakamura, S. I., Suzui, N., Yin, Y. G., Ishii, S., Kawachi, N., Kojima K., Sekimoto H., Yokohama T., & Ohkama-Ohtsu, N. (2019). Elevated glutathione synthesis in leaves contributes to zinc transport from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 283, 416-423. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.003>
- Wu, M., Luo, Q., Liu, S., Zhao, Y., Long, Y., & Pan, Y. (2018). Screening ornamental plants to identify potential Cd hyperaccumulators for bioremediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 162, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.049>
- Xia, Y., Liu, J., Wang, Y., Zhang, X., Shen, Z., & Hu, Z. (2018). Ectopic expression of *Vicia sativa* Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (VsCCoAOMT) increases the uptake and tolerance of cadmium in *Arabidopsis*. *Environmental and Experimental Botany*, 145, 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.10.019>
- Xu, Z., Wang, M., Xu, D., & Xia, Z. (2020). The *Arabidopsis* APR2 positively regulates cadmium tolerance through glutathione-dependent pathway. *Ecotoxicology and environmental safety*, 187, 109819. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109819>

- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167-179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>
- Zayed, A., Gowthaman, S., & Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of environmental quality*, 27(3), 715-721. <https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700030032x>
- Zhang, Y. W., Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (2004). Cloning and characterization of type 2 metallothionein-like gene from a wetland plant, *Typha latifolia*. *Plant Science*, 167(4), 869-877. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.040>
- Zhang, Y., Zhao, L., Wang, Y., Yang, B., & Chen, S. (2008). Enhancement of heavy metal accumulation by tissue specific co-expression of *iaaM* and ACC deaminase genes in plants. *Chemosphere*, 72(4), 564-571. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.043>
- Zhang, Y., Liu, J., Zhou, Y., Gong, T., Wang, J., & Ge, Y. (2013). Enhanced phytoremediation of mixed heavy metal (mercury)–organic pollutants (trichloroethylene) with transgenic alfalfa co-expressing glutathione S-transferase and human P450 2E1. *Journal of hazardous materials*, 260, 1100-1107. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.065>
- Zhang, H., Liu, H., Yang, R., Xu, X., Liu, X., & Xu, J. (2019). Over-expression of PttEXPA8 gene showed various resistances to diverse stresses. *International journal of biological macromolecules*, 130, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.115>
- Zhong, B., Chen, J., Shafi, M., Guo, J., Wang, Y., Wu, J., Ye Z., He L., & Liu, D. (2017). Effect of lead (Pb) on antioxidation system and accumulation ability of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 138, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.020>
- Zhu, Q., Zhang, J., Yu, H., Li, L., Chen, X., Jiang, M., & Tan, M. (2019). Maize Cd-tolerant ZmVTE4 encoding γ -tocopherol-methyl-transferase alleviated Cd-toxicity through its product α -tocopherol. *Environmental and experimental botany*, 158, 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.019>
- Zhu, Y. X., Du, W. X., Fang, X. Z., Zhang, L. L., & Jin, C. W. (2020). Knockdown of BTS may provide a new strategy to improve cadmium-phytoremediation efficiency by improving iron status in plants. *Journal of hazardous materials*, 384, 121473. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121473>

IX. ANEXOS

9.1 Tratamiento de residuos con Pb

A los residuos líquidos se adiciona $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hasta observar que la solución se torna turbia, esta mezcla se coloca en un recipiente de boca ancha cubierta con una malla y se coloca en un sitio al aire libre hasta que se evapore totalmente el líquido.

Los residuos vegetales se recolectan y secan.

Una vez secos, ambos residuos se almacenan en recipientes rígidos etiquetados según los lineamientos de la Subcomisión Mixta de Higiene y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas.

X. GLOSARIO

Absorción: Es un proceso físico donde átomos, iones o moléculas pasan de una primera fase a otra, incorporándose al volumen de la segunda.

Adsorción: Es un proceso físico donde átomos, iones o moléculas son retenidos en la superficie de un material.

Apoplasto: Espacio extracelular periférico de las células vegetales por el que fluyen agua y otras sustancias.

Biodisponibilidad: Característica de un metal que depende de la especie que se encuentra en el medio y que le permite ser captado por un organismo.

Bioacumulación: Proceso de acumulación de sustancias químicas en organismos vivos de forma que estos alcanzan concentraciones más elevadas que las concentraciones en su medio o en los alimentos.

Compartimentalización: Aislamiento y acumulación de un metal en un sitio del tejido vegetal donde no hay efectos tóxicos para la planta.

Eflujo: Mecanismo de transporte que requiere gasto de energía y disminuye la concentración de una sustancia en el interior celular.

Exudados: Cualquier sustancia secretada a través de los tejidos de las plantas.

Floema: Tejido conductor de una planta que se ocupa del transporte de nutrientes de la parte aérea fotosintética y autótrofa hacia las partes basales subterráneas, no fotosintéticas.

Hidroponía: Método utilizado para cultivar plantas usando disoluciones minerales en vez de suelo agrícola.

Quelación: Formación de complejos con iones metálicos y un compuesto con dos o más ligando. Proceso que disminuye la toxicidad de los metales pesados.

Tolerancia a metales: Capacidad natural heredable de una especie para sobrevivir y reproducirse en sitios con alta concentración de metales.

Xilema: Tejido vegetal lignificado de conducción que suministra agua, sales minerales y otros nutrientes desde la raíz hasta las hojas de las plantas.